

Funktionelle Spermatozoenparameter und ihre Relevanz im ART-Labor

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sabine Schüller-Exner, geb. Schüller
geboren am 24. Juli 1982 in Leinfelde

2009

Gutachter

1: Prof. Dr. med. Heiko Wunderlich, Jena

2: Prof. Dr. med. Hermann M. Behre, Halle (Saale)

3: Prof. Dr. med. Jürgen Weiß, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.05.2011

Abkürzungsverzeichnis

CMA ₃	Chromomycin A3; Guanin-Cytosin-spezifisches Fluorochrom, genutzt für eine Fluoreszenzfärbung zur Darstellung eines Protaminmangels
DHE	Dihydroethidium; Fluoreszenzfärbung zum Nachweis intrazellulärer ROS-Produktion in Spermien
DNA	Deoxyribonucleic acid; Träger der genetischen Information
FSH	Follikelstimulierendes Hormon; Sexualhormon, stimuliert im weiblichen Organismus die Follikelreifung und im männlichen die Spermatogenese
ICSI	Intracytoplasmatic sperm injection; Methode der künstlichen Befruchtung, bei der ein einzelnes Spermium direkt in eine Eizelle eingebracht wird
IUI	Intrauterine Insemination; Methode der künstlichen Befruchtung, bei der das aufbereitete Ejakulat in den Uterus eingebracht wird
IVF	In-vitro-Fertilisation; Methode der künstlichen Befruchtung, bei der aufbereitetes Ejakulat und Eizellen außerhalb des Körpers zusammengebracht werden
OAT-Syndrom	Kombination von Oligozoospermie, Asthenozoospermie und Teratozoospermie, d.h. das gleichzeitige Auftreten einer zu geringen Spermienanzahl, einem zu geringen Anteil progressiv beweglicher Spermien und einem zu hohen Prozentsatz fehlgebildeter Spermien
PBS	Phosphate buffered saline; Pufferlösung zur Verwendung in Labors

ROS	Reactive Oxygen Species; hoch reaktive Substanzen, welche in allen Körperzellen physiologischerweise im Rahmen des Energiestoffwechsels produziert werden
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences; Statistik-Software
SSC	Standard Saline Citrate
TdT-Enzym	Terminal deoxynucleotidyl transferase; ein Enzym, welches die Bindung von Nukleosidtriphosphaten an das 3'-OH-Ende der DNA katalysiert, genutzt im Rahmen des TUNEL-Assays
TNP	Transition nuclear protein; ein zwischengeschaltetes Protein, welches Histone in der Spermien-DNA ersetzt, dies dient der Vorbereitung für den Einbau von Protaminen im Rahmen der Chromatinkondensation
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-fluorescein nick end labelling; Testsystem zur Visualisierung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

0	Zusammenfassung	1
1	Einleitung	3
1.1	Infertilität und Sterilität	3
1.2	Assistierte Reproduktion	4
1.2.1	Spermienaufbereitungstechniken	4
1.2.2	Intrauterine Insemination, In-Vitro-Fertilisation und Intrazy- toplasmatische Spermieninjektion	5
1.3	Das menschliche Spermatozoon	6
1.3.1	Aufbau	6
1.4	Spermienreifung	7
1.4.1	Spermatogenese	7
1.4.2	Spermiogenese	8
1.5	Spermienfunktion	9
2	Ziele der Arbeit	11
3	Materialien und Methoden	13
3.1	Patienten	13
3.2	Untersuchungsmaterial und Ejakulatanalyse	13
3.3	Laborchemische Untersuchungen	14

3.4	Spermienaufbereitung mittels Swim-Up	14
3.5	Eosin – Vitalität	14
3.6	Peroxidasereaktion – Leukozytenfärbung	15
3.7	Spermienfunktionstests	15
3.7.1	TUNEL-Assay – DNA-Fragmentation	15
3.7.2	Dihydroethidium – Nachweis intrazellulärer Sauerstoffradikale	16
3.7.3	Anilinblau – Chromatinkondensation	16
3.7.4	Chromomycin A ₃ – Chromatinkondensation	17
3.8	Fotodokumentation	17
3.9	Statistische Auswertung	18
4	Ergebnisse	19
4.1	Daten zur Untersuchungsgruppe	19
4.2	Ergebnisse der Spermiogrammbefunde vor und nach Aufbereitung	20
4.3	Vitalität	22
4.4	Leukozyten	22
4.5	pH-Wert	22
4.6	FSH	23
4.7	Testosteron	23
4.8	Ergebnisse der Funktionstests	23
4.8.1	DNA- Fragmentation (TUNEL-Assay)	23
4.8.2	Reaktive Sauerstoffspezies (DHE-Färbung)	26
4.8.3	Chromatinkondensation	27
4.8.3.1	Anilinblau	27
4.8.3.2	Chromomycin A ₃	29

4.9	Korrelationen der Spermiogrammparameter	30
4.9.1	Dichte	30
4.9.1.1	Der Zusammenhang von Dichte und Motilität	30
4.9.1.2	Der Zusammenhang von Dichte und Vitalität	31
4.9.1.3	Der Zusammenhang von Dichte und TUNEL-Assay .	31
4.9.1.4	Der Zusammenhang von Dichte und ROS-produzie- renden Spermien	32
4.9.2	Motilität	33
4.9.2.1	Der Zusammenhang von Motilität und TUNEL-Assay	34
4.9.2.2	Der Zusammenhang von Motilität und Chromatin- kondensation	35
4.9.3	Vitalität	36
4.9.3.1	Der Zusammenhang von Vitalität und TUNEL-Assay	36
4.9.3.2	Der Zusammenhang von Vitalität und ROS-Produk- tion	37
4.9.3.3	Der Zusammenhang von Vitalität und Chromomycin A ₃ -Färbung	37
4.9.4	FSH	38
4.9.4.1	Der Zusammenhang von FSH und Dichte	38
4.9.4.2	Der Zusammenhang von FSH und Motilität	39
4.9.4.3	Der Zusammenhang von FSH und TUNEL-Assay . .	40
4.9.5	Testosteron	40
4.9.6	DNA-Fragmentation – TUNEL-Assay	41
4.9.6.1	Der Zusammenhang der Ergebnisse des TUNEL-As- says vor und nach Aufbereitung	41

4.9.6.2	Der Zusammenhang von TUNEL-Assay und ROS-Produktion	41
4.9.6.3	Der Zusammenhang von TUNEL-Assay und Chromomycin A ₃ -Färbung	41
4.9.7	Dihydroethidium - ROS-Färbung	42
4.9.7.1	Der Zusammenhang von ROS-Färbung und Spermogrammparametern	42
4.9.7.2	Der Zusammenhang von ROS-Färbung und Färbungen zur Chromatinkondensation	43
4.9.8	Chromatinkondensation I – Anilinblaufärbung	44
4.9.9	Chromatinkondensation II – Chromomycin A ₃ -Färbung	44
5	Diskussion	46
5.1	Klassische Spermogrammparameter vor und nach Aufarbeitung	46
5.2	Der Einfluss der Aufarbeitung auf funktionelle Spermatozoenparameter	48
5.3	Leukozyten, Radikale Sauerstoffspezies und DNA-Schäden	51
5.4	Chromatinkondensation	54
5.5	Zusammenhänge zwischen klassischen Spermogrammparametern und Spermienfunktionstests	57
5.6	Die Relevanz funktioneller Spermatozoenparameter	59
6	Schlussfolgerungen	63
	Literaturverzeichnis	65
	Abbildungsverzeichnis	75
	Tabellenverzeichnis	77

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	vii
---------------------------	-----

A Anhang	79
-----------------	-----------

A.1 Danksagung	79
--------------------------	----

A.2 Tabellarischer Lebenslauf	81
---	----

A.3 Ehrenwörtliche Erklärung	83
--	----

Kapitel 0

Zusammenfassung

Die klassischen SpermioGrammparameter werden, wenngleich nach wie vor Basisuntersuchung in der andrologischen Diagnostik, durch mehrere Spermienfunktions-tests ergänzt. Diese gehören jedoch noch nicht zur Routine in den andrologischen Laboratorien, nicht zuletzt da ihre Wertigkeit umstritten ist. Die vorliegende Arbeit evaluiert klassische und funktionelle Spermatozoenparameter, ihre Zusammenhänge und den Einfluss der Aufarbeitung durch Swim-Up.

Das grundlegende Prinzip der genutzten Spermienseparationstechnik Swim-Up ist die Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen, und so konnte eine signifikante Verbesserung der Motilität nach Aufarbeitung verzeichnet werden. Gleichzeitig verringerte sich die Anzahl der Spermien in der aufgearbeiteten Probe. Es wurden dabei die besten Resultate hinsichtlich Zelldichte und Motilität erzielt, wenn bereits im Ausgangsbefund normwertige Ergebnisse laut WHO-Vorgaben vorlagen.

Die Swim-Up-Technik ist jedoch nicht unumstritten, da der Teilschritt der Zentrifugation zu einem intensiveren Kontakt von Spermien und schädlichen Sauerstoffradikalen, unter anderem produziert durch Leukozyten, führt. Dies kann durch Oxidation zu Schädigungen der DNA in Form von Strangbrüchen führen. Anhand der Ergebnisse des TUNEL-Assays, der Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA markiert, ist nach Aufarbeitung stets ein höherer Prozentsatz von fragmentierter DNA gefunden worden. Ob dies tatsächlich durch die Aufarbeitungstechnik verursacht wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ergründet werden.

Ferner wurden zwei Färbungen zur Erfassung der Chromatinkondensation auf ihren Zusammenhang zueinander evaluiert. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte jedoch zwischen der Anilinblaufärbung und der Chromomycin A₃-Färbung nicht gefunden werden.

Nach Ejakulataufarbeitung durch Swim-Up erhöhte sich der Prozentsatz chromatinkondensierter Spermien sowohl bei Erfassung des Chromatinstatus anhand der Anilinblau- als auch der Chromomycin A₃-Färbung.

Wenngleich keinerlei Zusammenhänge der SpermioGrammparameter Motilität und Spermindichte zum mittels Anilinblaufärbung evaluierten Chromatinstatus gefunden wurden, kam es bei Vorliegen eines OAT-Syndroms zu einer erhöhten Anzahl anilinpositiver, d.h. unzureichend chromatinkondensierter, Spermien.

Im Rahmen der Spermienreifung kommt es gezielt zur Induktion von DNA-Strangbrüchen. Fehler der Spermiogenese, also eine nicht korrekt abgelaufene Chromatinkondensation, können also einher gehen mit Strukturschäden der DNA. Das gleichzeitige Auftreten von DNA-Fragmentation und einem Protamindefizit wurde auch in der vorliegenden Arbeit durch eine signifikant positive Korrelation der Anzahl TUNEL-positiver mit CMA₃-positiven Spermien bestätigt.

Die in Spermien vorkommenden intrinsischen radikalen Sauerstoffspezies werden ebenfalls für Schäden der Spermien-DNA verantwortlich gemacht. Die vorliegende Arbeit konnte diesen Zusammenhang zwischen der ROS- und der TUNEL-Färbung jedoch nicht nachweisen.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Infertilität und Sterilität

Die Thematik des unerfüllten Kinderwunsches ist in den letzten Jahrzehnten zunehmend in die Öffentlichkeit gerückt. Das Verschieben der Kinderplanung in eine spätere Lebensphase der Frau sowie eine eingeschränkte Spermienqualität des Mannes sind die typischen Probleme, die verantwortlich gemacht werden für die steigende ungewollte Kinderlosigkeit in den Industrienationen. Im Gegenzug sind die Techniken der assistierten Reproduktion immer weiter untersucht und verbessert worden.

Während historische Ansichten zur Unfruchtbarkeit die Ursache dieser bei der Frau suchten, rücken zunehmend auch andrologische Faktoren in den Fokus. Dabei ist die Grundlage jeder andrologischen Diagnostik, abgesehen von der ausführlichen Anamnese und der klinisch-urologischen Untersuchung (Jequier 2004), das klassische Spermioogramm (Bhasin 2007), wobei die entscheidenden Ergebnisse die zur Spermiedichte, -morphologie und -motilität sind. Zusätzlich zu diesen Basisuntersuchungen haben zahlreiche weitere Techniken den Blick in das menschliche Spermatozoen ermöglicht. Hierbei zu nennen sind Färbungen zur DNA-Stabilität sowie zur Chromatinkondensation. Der genaue Wert dieser Untersuchungen, vor allem in Bezug auf Befruchtung und Schwangerschaft, wird seit Jahren kontrovers diskutiert (Henkel et al. 2004, Benchaib et al. 2007, Lin et al. 2008).

1.2 Assistierte Reproduktion

1.2.1 Spermienaufbereitungstechniken

Grundsätzliches Ziel aller Methoden zur Spermatozoenpräparation ist die Gewinnung einer Fraktion progressiv motiler und morphologisch normaler Spermien in ausreichender Zahl. Ferner erfolgt die Trennung dieser selektierten Keimzellen von Seminalplasma, Zelldetritus und Bakterien. Grundlage aller Techniken ist zum einen die Eigenbeweglichkeit der Spermien, so zum Beispiel bei Aufschwimmtechniken oder Methoden der Dichtegradientenzentrifugation, zum anderen die Filtration (Henkel und Schill 2003).

Eine weit verbreitete, da einfache und kostengünstige Methode, ist die **Swim-Up-Technik**. Hierbei werden Ejakulat und ein spezielles Präparationsmedium vermischt, gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand, welcher das Seminalplasma enthält, entfernt und das Pellet wird erneut mit Medium überschichtet und inkubiert. Mobile Spermien gelangen während der Inkubationszeit aufgrund ihrer Eigenbeweglichkeit in das Medium und können nach einer Zeit von 45 bis 90 Minuten vorsichtig mit dem flüssigen Medium abpipettiert werden. Man erhält so eine sehr reine Fraktion hochmotiler Spermien, die Methodik ist jedoch nur für Ejakulate ausreichender Spermatozoendichte und Motilität geeignet. Ferner wird eine Schädigung der Spermien durch die Zentrifugation und den dadurch verursachten Schaden durch reaktive Sauerstoffspezies diskutiert (Twigg et al. 1998).

Auch die **Glaswollfiltration** bietet bei wenig Arbeitsaufwand eine reine Fraktion motiler Spermien. Das verflüssigte Ejakulat wird über Glaswolle gegeben, das so gewonnene Filtrat wird gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert. Dabei werden sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch Leukozyten zum Teil reduziert, jedoch ist die Reinheit nicht mit der anderer Methoden vergleichbar. Vorteilhaft ist, dass auch Ejakulate mit geringer Dichte und Motilität bearbeitet werden können.

Eine sehr schonende Methode ist die **Migrations-Sedimentations-Technik**. Spezielle Glasröhrchen werden mit Medium befüllt, das Ejakulat wird auf einen äußeren

Ring um einen im Glasröhrchen befindlichen Konus geschichtet, und während der Inkubationszeit gelangen motile Spermien durch ihre Eigenbeweglichkeit in das Medium, so dass sie abpipettiert werden können. Auch diese Technik ist, analog zum Swim-Up, beschränkt auf Ejakulate mit guter Dichte und Motilität, die Ausbeute jedoch ist geringer.

1.2.2 Intrauterine Insemination, In-Vitro-Fertilisation und Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Für die verschiedenen Methoden der Assistierte Reproduktion wird grundsätzlich aufbereitetes Ejakulat verwendet. Zum einen wird versucht durch die Aufbereitung bestehende Defizite des Ejakulates, die möglicherweise ein Versagen der natürlichen Fertilisation mit verursacht haben, zu bessern. Zu nennen sind hierbei vor allem die Motilität und auch die Morphologie, durch die Aufarbeitungsprozedur wird mitunter eine beeindruckende Verbesserung verzeichnet. Zum anderen ist es aus verschiedenen Gründen notwendig, das Seminalplasma zu entfernen. Es enthält potentiell infektiöse Partikel, kann zytotoxisch auf die Spermien wirken und durch die vorhandenen Prostaglandine können bei einer intrauterinen Übertragung schwere Kontraktionen der Uterusmuskulatur ausgelöst werden.

Es werden drei grundlegende Methoden der Assistierte Reproduktion unterschieden: Die **Insemination**, zumeist intrauterin durchgeführt (IUI), besteht in der Einbringung des aufgearbeiteten Ejakulates zum Konzeptionsoptimum im monofollikulären Zyklus. Die **In-Vitro-Fertilisation** (IVF) und die **Intrazytoplasmatische Spermieninjektion** (ICSI) erfolgen im polyfollikulären Zyklus. Gemeinsam ist beiden Methoden, dass die zu befruchtenden Eizellen mittels Punktion gewonnen und extrakorporal befruchtet werden. Bei der IVF kommt es zum Zusammenbringen von Eizellen und Spermien in der Kulturschale, wobei die Spermien die Zona pellucida selbständig überwinden müssen. Im Gegensatz dazu wird bei der ICSI gezielt ein einzelnes Spermium mittels Pipette in die Oozyte eingebracht. Sowohl an die Technik der IVF als auch an die der ICSI schließt sich der Embryonentransfer in den Uterus an.

1.3 Das menschliche Spermatozoon

1.3.1 Aufbau

Ein Spermium besitzt eine Gesamtlänge von circa $50\text{ }\mu\text{m}$, wovon $5\text{ }\mu\text{m}$ auf den Kopf und die restlichen $45\text{ }\mu\text{m}$ auf den Schwanz entfallen.

Der Kopf mit einer Länge von $3\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$, einer Breite von $2\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$ und einer Dicke von maximal $1,5\text{ }\mu\text{m}$ enthält die männliche Erbinformation auf engstem Raum. Durch die besondere Art der Chromatinkondensation, die sich von der somatischer Zellen unterscheidet, findet man in Spermien die am stärksten kondensierte DNA eukaryontischer Zellen (Agarwal und Said 2004). Ungefähr 40-70% des Kopfes werden von dem Akrosom überzogen. Begrenzt von einer inneren und einer äußeren akrosomalen Membran enthält es eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem das Akrosin, die für eine erfolgreiche Zona-Penetration und damit Fertilisation notwendig sind.

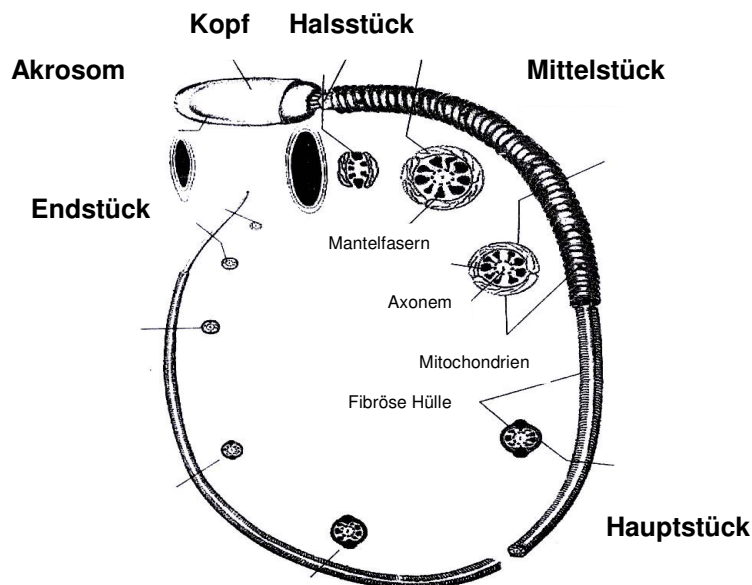


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Säugetierspermatozoons, modifiziert nach Fawcett (1975). Die Einteilung eines Spermiums in Kopf-, Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück ist dargestellt.

Über eine Basalplatte wird der Spermienkopf mit dem Halsstück verbunden. Das sich daran anschließende Mittelstück lässt sich bereits lichtmikroskopisch als verdicktes Schwanzsegment ausmachen. Diese Tatsache begründet sich im Vorhandensein von

Mitochondrien, den Energiequellen für die aktive Bewegung des Spermiums. Hals-, Mittel- und Hauptstück werden durchzogen von einem Axonem mit der charakteristischen 9+9+2 Struktur: einem zentralen Mikrotubuluspaar und neun Doppeltubuli. Damit eng assoziiert schließen sich nach außen die Mantelfasern an. Sie besitzen eine passiv-elastische Funktion und verringern die Wirksamkeit von Scherkräften auf das Spermatozoon (Baltz et al. 1990). Zusätzlich verbessern sie auch die Motilität durch Erhöhung des Drehmomentes und sorgen so für eine effizientere Energieausnutzung (Lindemann 1996, Henkel et al. 2003c).

1.4 Spermienreifung

1.4.1 Spermatogenese

Die Keimzellreifung geht aus von den Spermatogonien, die sich im basalen Bereich der Tubuli des Hodengewebes befinden, und schreitet von dort zentripetal zum Lumen hin voran. Dabei werden die Stammzellen unterteilt in A- und B-Spermatogonien, erstere noch in Ad (dark) und Ap (pale). Ein Teil der Spermatogonien, wahrscheinlich Ad, sichert den Bestand an Stammzellen und zeigt nur geringe Aktivität, die Ap-Spermatogonien hingegen teilen sich und differenzieren sich zu B-Spermatogonien weiter. Aus diesen werden durch eine mitotische Teilung die Spermatozyten, welche danach in die Meiose eintreten. Durch die erste Reifeteilung entstehen nun sekundäre Spermatozyten mit einem haploiden Chromosomensatz in doppelter Ausführung, der sich während der sich anschließenden zweiten meiotischen Teilung auf jeweils zwei Spermatiden aufteilt.

Beim Querschnitt durch einen Tubulus finden sich immer mehrere Entwicklungsstadien, wobei zeitlich aufeinanderfolgende Stufen auch in direkter räumlicher Nähe zu finden sind. Man bezeichnet dies als „spermatogenic wave“ (Schulze und Rehder 1984).

Ein menschlicher Spermatogenesezyklus dauert 16 Tage. Da die Entwicklung zu einem reifen Spermium vier Zyklen voraussetzt, umfasst die humane Spermatogenese eine Zeitdauer von 64 Tagen.

1.4.2 Spermiogenese

Noch sind die Spermatiden Rundzellen, doch durch den folgenden Prozess der Spermiogenese entstehen ausdifferenzierte Spermatozoen. Dafür sind mehrere Reifeschritte notwendig. In der Golgi-Phase entwickelt sich als Vorbereitung auf den sich anschließenden Schritt das Akrosombläschen aus lysosomalem Material, ferner beginnt die Differenzierung des Spermatids in Kopf und Schwanzpartie. Die Kappenphase resultiert in der Ausbildung des Akrosoms, welches bis zu zwei Drittel des Spermienkopfes bedeckt. Auch in der Akrosomphase schreitet die Polarisierung des Spermatids durch Ausbildung eines Flagellums fort. Außerdem dient dieser Reifungsschritt der endgültigen Verpackung der DNA. Während eines früheren Entwicklungsschrittes wurden lysinreiche Histone in der Spermien-DNA eingebaut. Im weiteren Verlauf werden diese jedoch wieder entfernt und kurzzeitig durch Transition Proteins (TNP's) ersetzt. Die endgültige Chromatinkondensation erfolgt schließlich durch den Einbau cysteinreicher Protamine (Agarwal und Said 2004). In der Reifungsphase schließlich erhält das Spermium durch die Abstoßung des restlichen Zytoplasmas seine elongierte und polarisierte Form mit Einteilung in Kopf und Schwanz und wird durch den Prozess der Spermiation in das Tubulushumen abgegeben.

Diese verschiedenen Phasen der Spermiogenese laufen nicht strikt geordnet nacheinander ab, sondern greifen ineinander über (Clermont 1963).

Von den Tubuli seminiferi gelangen die Spermien in das Rete testis und über die Ductuli efferentes in den Nebenhoden, wo sie noch mehrere Tage verbleiben. Die vom Nebenhoden sezernierten Proteine sorgen für eine abschließende Reifung des Spermiums und dessen Fähigkeit, an die Zona pellucida zu binden (Nieschlag und Habenicht 1992). Eine verfrühte Aktivierung der Motilität wird verhindert, so dass die Spermien ihre Energie nicht vorzeitig aufbrauchen. Andererseits wird erst im Nebenhoden durch Entfernen von Zink aus den Mantelfasern des Flagellums die eigentliche Progressivmotilität der Spermien ermöglicht. Spermien, denen diese Nebenhodenreifung versagt wurde, können eine Eizelle auf natürlichem Wege nicht befruchten.

1.5 Spermienfunktion

Eine Vielzahl an Faktoren zeigt Einfluss auf die physiologische Funktion von Spermatozoen (Henkel et al. 2005b) und damit auf deren Fähigkeit, eine Eizelle zu befruchten und eine Schwangerschaft zu erzeugen.

Die **Chromatinkondensation** ist ein Schritt im Rahmen der Spermienreifung. Hierbei wird die Erbinformation des Spermiums auf kleinstem Raum gepackt, also kondensiert. Erreicht wird dies durch den Ersatz der in den somatischen Zellen im Zellkern vorkommenden Histone durch Protamine. In mehreren Zwischenschritten, wobei zunächst Histone gegen Transitionsproteine und diese schließlich gegen die Protamine ausgetauscht werden, gelingt es, die DNA enorm platzsparend zu organisieren. So wird die Spermien-DNA vor Angriffen und potentiellen Schäden, wie Strangbrüchen, geschützt (Oliva 2006). Außerdem ist eine korrekte Chromatinkondensation essentiell für die während der Vorkernbildung in der Eizelle stattfindende Chromatindekondensation. Es konnten wiederholt Zusammenhänge von fehlerhafter Chromatinkondensation und Infertilität gefunden werden. Dabei ist ein möglicher Gradmesser das Vorhandensein von Protaminen. Ein Protamindefizit ging laut der Veröffentlichung von Carrell und Liu (Carrell und Liu 2001) einher mit erniedrigter Motilität und einem geringeren Anteil normomorpher Spermien, Aoki (Aoki et al. 2005) fand eine erhöhte Rate an DNA-Fragmentation bei niedrigen Protaminwerten.

Ferner ist für eine erfolgreiche Befruchtung die **Integrität der Spermien-DNA** ein entscheidender Faktor. Es werden drei Hauptursachen für DNA-Strukturschäden bei Spermatozoen diskutiert. Zum einen werden in Rahmen der Spermatogenese, speziell beim Packen des Chromatins, gezielt Strangbrüche von Nucleasen generiert. Dies nimmt kurzzeitig die Spannung aus dem DNA-Strang und ermöglicht so die Chromatinkondensation. Physiologischerweise werden diese Brüche schnellstmöglich wieder ligiert. Der erhöhte Prozentsatz von DNA-Fragmentation in ejakulierten Spermatozoen ist also mitbedingt durch eine abnorme Chromatinkondensation. Desweiteren kann ein gesteigerter DNA-Fragmentationsindex als Apoptosezeichen gewertet werden. Auch dieser Prozess ist prinzipiell als physiologisch im Kontext der Spermio-

genese zu sehen, da so die Zellzahl reguliert wird und potentiell defekte Spermien auf diesem Weg eliminiert werden, bevor der Schaden weitergetragen werden kann. Ein dritter Auslöser für DNA-Strangbrüche sind freie Sauerstoffradikale. Auch hier gilt, dass ein geringer Anteil radikaler Sauerstoffspezies nicht krankhaft ist. Unter anderem wird der Prozess der Kapazitation durch diese reaktiven oxidierenden Substanzen begleitet.

Kapitel 2

Ziele der Arbeit

Die fortschreitende medizinische Entwicklung in Behandlung und Diagnose der ungewollten Kinderlosigkeit verlangt nach differenzierten Methoden im andrologischen Sektor. Auch wenn das Basisspermiogramm nach wie vor Grundlage jeder andrologischen Diagnostik ist, gibt es Gründe für weiterführende Untersuchungen. Gerade bei unklaren Ursachen für den Misserfolg im Rahmen von Maßnahmen zur assistierten Reproduktion können funktionelle Spermatozoenparameter weitere Erkenntnisse liefern. Wenngleich zahlreiche Tests zur Evaluierung der Spermienfunktion existieren, so wird deren Wertigkeit nach wie vor kontrovers diskutiert. Ziel dieser Arbeit ist es daher, einige funktionelle Spermatozoenparameter genauer zu untersuchen. Dabei sollen sie nicht nur zu den klassischen Spermiogrammparametern in Bezug gesetzt werden, sondern auch auf eventuelle Zusammenhänge untereinander geprüft werden. Zur Auswertung kommen Daten des Spermiogramms, wie Spermatozoenkonzentration und -motilität, und Färbemethoden zur DNA-Fragmentation (TUNEL-Assay), intrazellulären Produktion radikaler Sauerstoffspezies (ROS-Färbung) und Chromatinkondensation (Anilinblaufärbung, Chromomycin A₃-Färbung). Diese Parameter wurden sowohl vom Nativejakulat als auch vom durch Swim-Up aufbereiteten Ejakulat ermittelt. Außerdem wurden pH-Wert und Leukozytenzahl (Peroxidasefärbung) erfasst. Speziell die Färbungen Anilinblau und Chromomycin A₃ sollen hinsichtlich der Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse überprüft werden. Hintergrund dieser Fragestellung ist die Tatsache, dass die Anilinblaufärbung einen geringeren finanziellen und zeitlichen Aufwand zur Erfassung des Chromatinstatus bietet, allerdings Zu-

sammenhänge zu anderen Spermatozoenparametern in der aktuellen Literatur abweichend erörtert werden.

Zusammenfassend sind als Ziele dieser Arbeit zu nennen:

- die Erfassung möglicher Zusammenhänge zwischen den klassischen Spermatozoenparametern, speziell Spermiendichte und Motilität, und den Ergebnissen der Funktionstest, wie DNA-Fragmentation, Chromatinkondensation und Bildung radikaler Sauerstoffspezies
- das Durchführen eines Methodenvergleichs zwischen zwei Färbungen zur Chromatinkondensation, der Anilinblaufärbung und der Chromomycin A₃-Färbung
- das Treffen einer Aussage bezüglich des gemeinsamen Auftretens von DNA-Fragmentation und fehlerhafter Chromatinkondensation
- das Feststellen eines Einflusses der Aufarbeitungstechnik Swim-Up auf klassische und funktionelle Spermatozoenparameter

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Patienten

Für die Untersuchungen wurden Ejakulate von 70 Patienten verwendet, die die Sterilitätssprechstunde der Universitätsfrauenklinik Jena konsultierten. Dabei handelte es sich um 42 diagnostische und 28 therapeutische Untersuchungen, letztere unterteilt in 15 Patienten für IVF und 13 für ICSI.

3.2 Untersuchungsmaterial und Ejakulatanalyse

Die Ejakulate wurden nach 2-5 Tagen Abstinenz durch Masturbation gewonnen. Von allen Ejakulaten wurden Proben für mikrobiologische Untersuchungen eingesandt. Es erfolgte sowohl die Keimzahlbestimmung nach einer 48-Stunden-Kultur als auch ein Test auf Chlamydien. Nach der Liquefizierung für circa 30 Minuten bei 37°C wurde ein Spermiogramm nach den WHO-Kriterien (Bals-Pratsch et al. 1999) erstellt, wobei Daten zur Spermatozoenkonzentration, Morphologie, Motilität, Vitalität und pH-Wert ermittelt wurden. Anschließend erfolgte die Spermaaufbereitung mittels Swim-Up-Technik. Sowohl vom nativen als auch vom aufbereiteten Ejakulat wurden Proben für weitere Funktionstests entnommen.

3.3 Laborchemische Untersuchungen

Von insgesamt 34 Patienten lagen zusätzlich der FSH- und der Testosteronwert (freies Testosteron) im Serum vor.

3.4 Spermienaufbereitung mittels Swim-Up

Für die Durchführung des Swim-Up wurde das Ejakulat in gleich großen Portionen auf vier Zellkulturröhrchen (Falcon) aufgeteilt und mit der zwei- bis dreifachen Menge eines Spermienpräparationsmediums (Medicult GmbH) aufgefüllt und durchmischt. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 1400 U/min wurde der Überstand abgehoben und das Pellet erneut mit 2 ml Medium vermischt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, die überstehende Flüssigkeit vorsichtig abgezogen und das Sediment mit 0,5 ml Medium überschichtet. Anschließend wurden die vier Tubes für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre in Schrägstellung inkubiert. Danach wurden die Überstände aller vier Röhrchen zusammengefasst und wiederum für fünf Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Mit dem in 0,4 ml Medium resuspendierten Sediment wurden der Befund erhoben und die Funktionsteste durchgeführt.

3.5 Eosin – Vitalität

Der Anteil vitaler Spermien wurde durch Eosinfärbung ermittelt. Dabei wurden 10 μ l Nativejakulat und 10 μ l Eosin-G (Merck) auf einen Objektträger gegeben und vermischt. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop, wobei vitale Zellen den Farbstoff ausschließen und folglich ungefärbt erscheinen, während tote Spermatozoen eine rote Färbung zeigen. Der Referenzwert der WHO (Bals-Pratsch et al. 1999) liegt bei mindestens 50% lebenden Spermien.

3.6 Peroxidasereaktion – Leukozytenfärbung

Hierfür wurden 5 ml σ -Toluidin mit 10 μ l H_2O_2 (1,5%) vermischt. Anschließend erfolgte die Inkubation von 10 μ l Ejakulat mit 190 μ l der Peroxidaselösung für 30 Minuten bei 37°C. Bei der Auswertung im Lichtmikroskop stellen sich Leukozyten als braun gefärbte Rundzellen dar. Der Grenzwert für Leukozyten im Ejakulat liegt bei 1 Mio./ml (Bals-Pratsch et al. 1999).

3.7 Spermienfunktionstests

3.7.1 TUNEL-Assay – DNA-Fragmentation

Der Anteil von Spermatozoen mit fragmentierter DNA wurde mit Hilfe des TUNEL- (TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling) Assays unter fluoreszenzmikroskopischer Auswertung (Gavrieli et al. 1992, Henkel et al. 2003a) ermittelt, wobei das Detection Kit der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet wurde.

Für die Ausstriche wurde gewaschenes Ejakulat verwendet. Dabei wurde das Ejakulat 1:5 mit PBS verdünnt und für 10 Minuten bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet erneut in PBS gelöst und der Vorgang wiederholt, allerdings das Pellet nur 1:1 in PBS gelöst. Von dieser Suspension wurde ein 70 μ l- Ausstrich auf einen Superfrost-Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) gemacht und dieser bei Raumtemperatur getrocknet. Der Ausstrich wurde in frisch zubereiteter 4%-Formaldehydlösung (in PBS) für 25 Minuten fixiert und danach in frischer PBS für 5 Minuten gewaschen. Es folgte das Permeabilisieren der Zellen in 0,2%-Triton-X-100 für 5 Minuten, zweimaliges Waschen in PBS (5 Minuten) und, nach Abklopfen überschüssiger Flüssigkeit, das Hinzufügen von 100 μ l Equilibrierungspuffer für 10 Minuten. Während dieser Zeit wurde der Inkubationspuffer mit den bereits aufgetauten 20 μ l Nukleotidmix, 1 μ l TdT-Enzym sowie 45 μ l Equilibrierungspuffer angesetzt. Nachdem 20 μ l des Inkubationspuffers auf den Ausstrich aufgebracht und beides mit einem Plastic-Cover-Slide bedeckt wurde, erfolgte eine 60minütige Inkubation unter Lichtschutz in einer feuchten Kammer bei 37°C.

Die Reaktion wurde beendet durch Eintauchen des Objektträgers in $2\times\text{SSC}$ für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem zweimaligen Waschen in frischer PBS (5 Minuten) und Entfernen überschüssiger Flüssigkeit wurde nach Zugabe eines Tropfens Anti-Fade-Solution und Aufbringen eines Deckgläschens die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop sofort begonnen.

3.7.2 Dihydroethidium – Nachweis intrazellulärer Sauerstoffradikale

Durch die Färbung mit Dihydroethidium (DHE), welches durch freie Sauerstoffradikale zu Ethidium oxidiert wird und dadurch seine Lichtemission verändert, gelingt der Nachweis intrazellulärer ROS-Produktion in den Spermien.

180 μl gewaschenes Ejakulat (Methodik siehe 3.7.1) wurden mit 20 μl DHE versetzt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Aufbringen eines Ausstriches auf einen Objektträger folgte die sofortige Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. ROS-produzierende Spermatozoen erscheinen rot fluoreszierend und wurden als ROS-positiv deklariert, ferner erfolgte eine Unterteilung in Spermien mit und ohne Zytoplasmotropfen.

3.7.3 Anilinblau – Chromatinkondensation

Dieser saure Farbstoff lagert sich an basische Histone der Spermien-DNA an. Je stärker die Blaufärbung der Spermatozoen, desto höher ist der Anteil der Histone in der Spermien-DNA. Die Einteilung ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Einteilung der Kategorien der Anilinblaufärbung

Kategorie 0:	ungefärbtes Spermium
Kategorie 1:	leichte Blaufärbung, akrosomaler Ring sichtbar
Kategorie 2:	Blaufärbung des kompletten Spermienkopfes oder mittlere bis starke Blaufärbung, die mehr als nur das postakrosomale Segment beinhaltet
Kategorie 3:	starke Blaufärbung des kompletten Spermienkopfes

Für den Ausstrich wurden 20 μl gewaschenes Ejakulat (Methodik siehe 3.7.1) auf einen Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Nach einer 30minütigen Fixierung in 3% Glutaraldehyd (25%, Calbiochem) schloss sich der eigentliche Färbeprozess für 7 Minuten mit Anilinblau (Sigma-Aldrich) an. Überschüssiger Farbstoff wurde mit PBS abgespült und der Ausstrich nach den oben genannten Kriterien im Lichtmikroskop ausgewertet.

3.7.4 Chromomycin A₃ – Chromatinkondensation

Der Fluoreszenzfarbstoff CMA₃ konkurriert mit den Protaminen der Spermien-DNA um eine Bindungsstelle. Bei korrekter Chromatinkondensation während der Spermatogenese sind alle Bindungsstellen bereits durch Protamine besetzt, so dass sich kein CMA₃ anlagern kann, die Spermien sind „CMA₃-negativ“ (Kategorie 0). Im Gegensatz dazu zeigt eine starke gelbe Fluoreszenz einen Protaminmangel an, die Spermien sind „CMA₃-positiv“ (Kategorie 2). Bei der Auswertung fiel eine weitere Gruppe von Spermien auf, welche weder eindeutig als gefärbt noch als ungefärbt klassifiziert werden konnte. Diese grenzwertigen Färbemuster, zumeist mit fluoreszierendem akrosomalen Ring, wurden in die Kategorie 1 eingeordnet.

Mittels Carnoy Mixture (Methanol/Essigsäure 3:1) wurde das gewaschene Ejakulat (Methodik siehe 3.7.1) für 8 Minuten bei 4°C fixiert. 70 μl der Suspension wurden auf einen Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und mit 100 μl CMA₃ (Sigma St Louis, MO, USA) (0,25 mg/ml in McIlvaine-Puffer [pH 7,0; beinhaltet 10 mM MgCl₂]) überschichtet. Nach 30 Minuten Inkubation unter Lichtschutz wurde der Farbstoff mit McIlvaine-Puffer abgespült, ein Tropfen Anti-Fade-Solution auf den Ausstrich aufgebracht und dieser im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.8 Fotodokumentation

Ausgewählte Ausstriche der Färbungen zur intrinsischen ROS-Produktion (Dihydroethidiumfärbung), zur Chromatinkondensation (Anilinblaufärbung) sowie zur DNA-Fragmentation (TUNEL-Assay) wurden fotografisch festgehalten. Die Aufnahmen

wurden mit einer Aufsetzkamera MC63 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurde ein Farbfilm ISO 400/27°C (Kodak, Stuttgart, Deutschland) verwendet.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Statistical Package of Social Studies - Software (SPSS, Version 15). Die Normalverteilungen der Daten wurden durch den Kolmogorov-Smirnov-Test ermittelt. Lag eine Normalverteilung vor, so erfolgte die Berechnung von Zusammenhängen zwischen einzelnen Parametern mittels Stichproben-Maßkorrelationskoeffizient nach Pearson, bei nicht normalverteilten Parametern wurde der Stichproben-Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman genutzt. Grafisch wurden diese Zusammenhänge durch Regressionsgeraden sichtbar gemacht. Mit Hilfe von Boxplots wurden die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen hinsichtlich mittlerer Lage, Streuung und Gestalt dargestellt. Zur Klärung der Frage nach signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Gruppen wurden die nichtparametrischen Tests H-Test nach Kruskal-Wallis und U-Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Für das Testen von mehreren Hypothesen wurde das Bonferroni-Holm-Verfahren angewendet.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Daten zur Untersuchungsgruppe

Für die Untersuchungen wurden die Ejakulate von insgesamt 70 Patienten der Sterilitätssprechstunde der Universitätsfrauenklinik Jena verwendet. 42 Proben wurden aus diagnostischen Zwecken untersucht, bei 28 Patienten erfolgte innerhalb der Therapie eine Aufbereitung.

Das Durchschnittsalter betrug 35,1 Jahre ($\pm 5,8$), wobei der jüngste Patient 22 Jahre und der älteste 51 Jahre waren.

60 Patienten wiesen eine gänzlich unauffällige bisherige Krankengeschichte auf, bei 10 Patienten wurden die in der Tabelle 4.1 aufgeführten auffälligen anamnestischen Daten erfasst.

Tabelle 4.1: Auffällige Befunde in der Anamnese

Anzahl der Patienten	Pathologische Befunde in der Anamnese
2	Varikozele
1	Z.n. Maldescensus
1	Z.n. Pendelhoden
1	Z.n. Vasektomie und Vasosvasostomie
3	Z.n. Inguinalhernioplastik
1	Z.n. Inguinalhernioplastik, Spermatozele
1	mehrfährige Behandlung mit Prednisolon

4.2 Ergebnisse der Spermogrammbeurteilung vor und nach Aufbereitung

Nach Auswertung der Spermogramme nach den Vorgaben der WHO (Bals-Pratsch et al. 1999) ergab sich die in der nachfolgenden Tabelle 4.2 aufgeführte Patientengruppierung.

Tabelle 4.2: Patientengruppierung anhand der Spermogrammwerte

	Anzahl der Patienten
Normozoospermie	16
Oligozoospermie	1
Asthenozoospermie	31
OAT-Syndrom	22

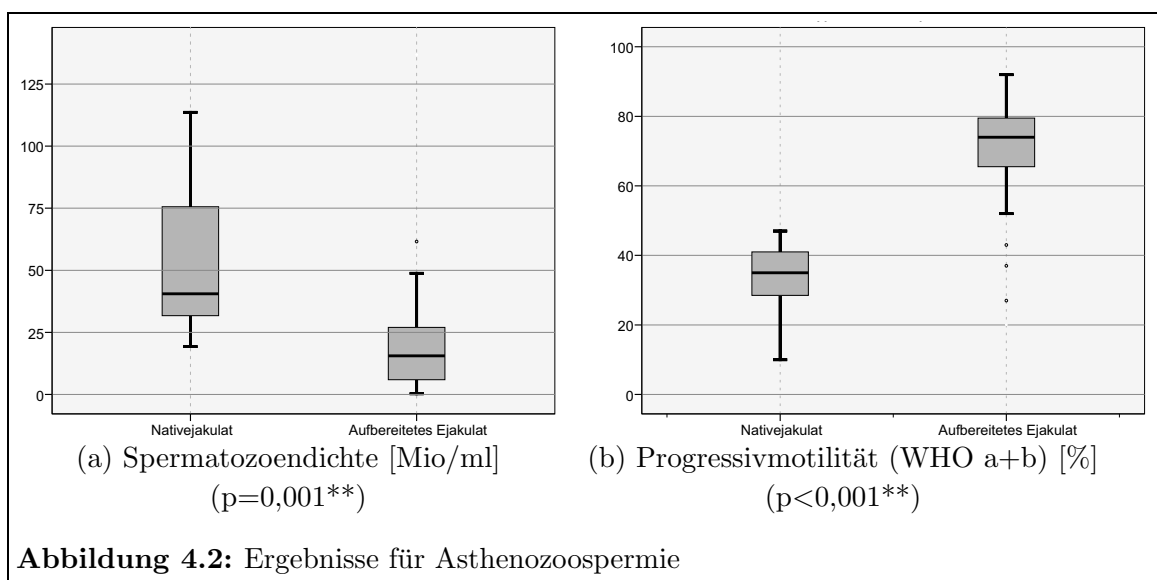
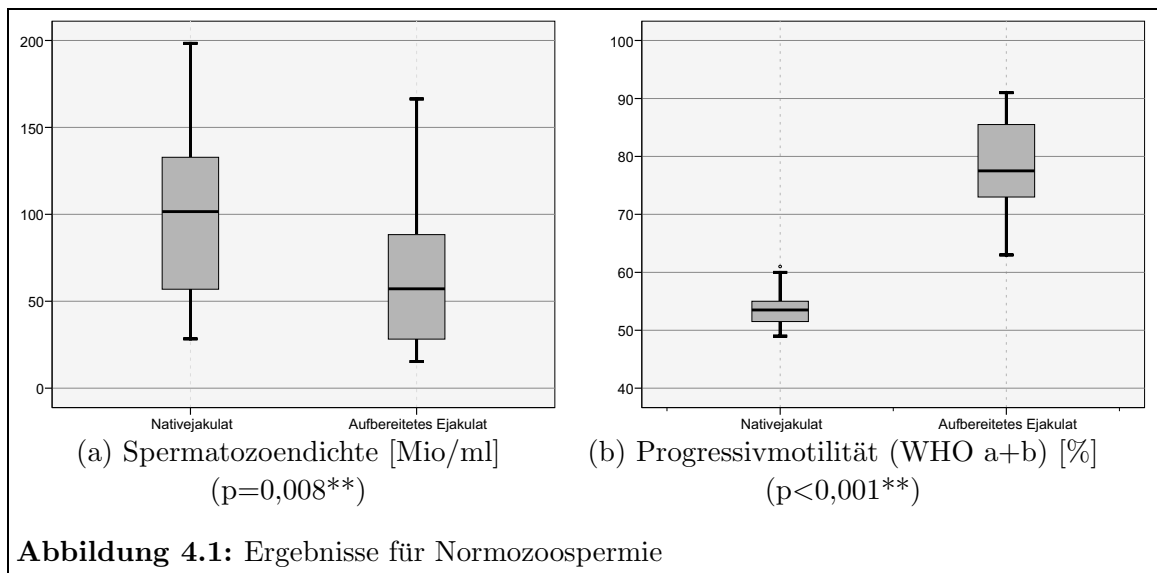
In die Gruppen der Oligoastheno- sowie der Teratozoospermie konnten keine Patienten eingegliedert werden.

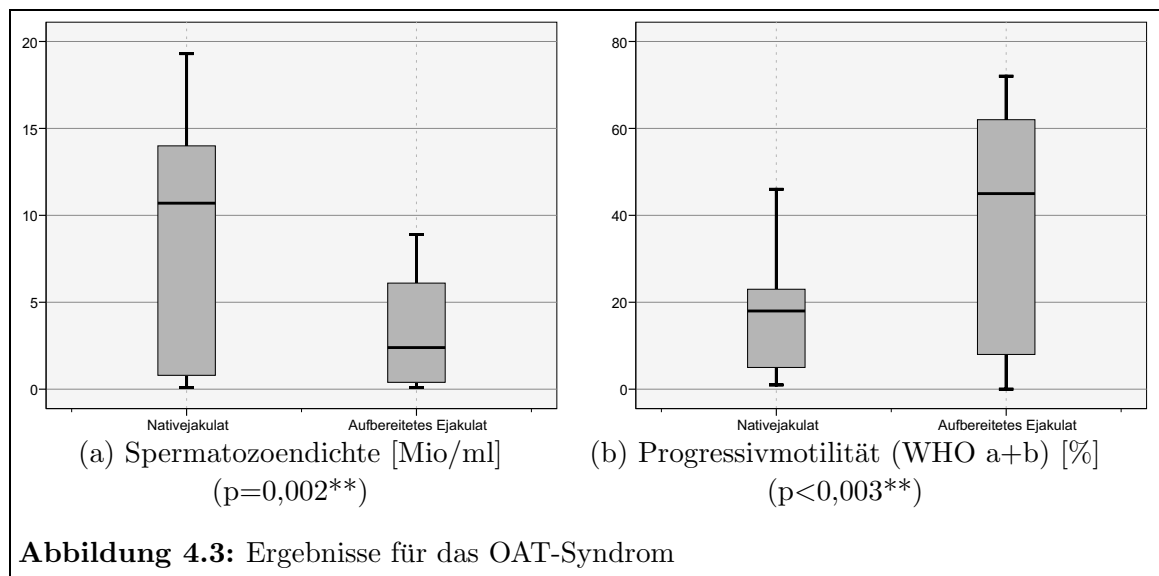
Hinsichtlich der Spermatozoendichte wiesen alle drei Gruppen nach Aufbereitung kleinere Spannweiten und Stichprobenquartilabstände auf, ebenso war der Median zu niedrigeren Werten hin verschoben (Normozoospermie: nativ 101,6 Mio/ml, Swim-Up 57,2 Mio/ml; Asthenozoospermie: nativ 40,55 Mio/ml, Swim-Up 15,55 Mio/ml; OAT-Syndrom: nativ 10,7 Mio/ml, Swim-Up 2,4 Mio/ml). Allerdings ist nicht von allen Proben die Dichte nach Swim-Up ermittelt worden, da teilweise das gesamte aufbereitete Ejakulat zu therapeutischen Zwecken genutzt wurde (IVF).

Sowohl in der Gruppe der Normo- als auch Astheno- bzw. Oligo-Asthenozoo-Teratozoospermie erhöhte sich nach Ejakulataufbereitung der prozentuale Anteil der progressiv beweglichen Spermien. Dabei verbesserte sich in allen drei Gruppen der Median (Normozoospermie: nativ 53%, Swim-Up 78%; Asthenozoospermie: nativ 35%, Swim-Up 74%; OAT-Syndrom: nativ 16%, Swim-Up 45%). In den beiden erst-

genannten lag sogar der Minimalwert nach Aufbereitung über dem Maximalwert des Nativejakulates.

Die Ergebnisse für Dichte und Motilität in den einzelnen Gruppen zeigen die Abbildungen 4.1 bis 4.3.





4.3 Vitalität

Mittels Eosinfärbung wurde der Anteil vitaler Spermien bestimmt. Die durchschnittliche Vitalität aller Proben betrug 40% (Median). 22 Ejakulate erreichten den von der WHO geforderten Referenzwert von mindestens 50% lebenden Spermatozoen.

4.4 Leukozyten

Der Median peroxidase-positiver Leukozyten im Ejakulat, ermittelt durch die Standard-Peroxidasefärbung, ergab 0,8 Mio./ml. Insgesamt 32 Proben haben den aktuellen Grenzwert von maximal 1 Mio. Leukozyten je ml Ejakulat überschritten und erfüllten so das Kriterium einer Leukozytospemie.

4.5 pH-Wert

Die erfassten pH-Werte lagen im Bereich von 7,2 bis 8,1. Somit wurde von allen Proben der Referenzwert von pH 7,2 oder höher erreicht.

4.6 FSH

Von insgesamt 34 Patienten wurden die FSH-Werte im Serum bestimmt. Der Minimalwert lag bei 1,20 mIU/ml und der Maximalwert bei 11,90 mIU/ml.

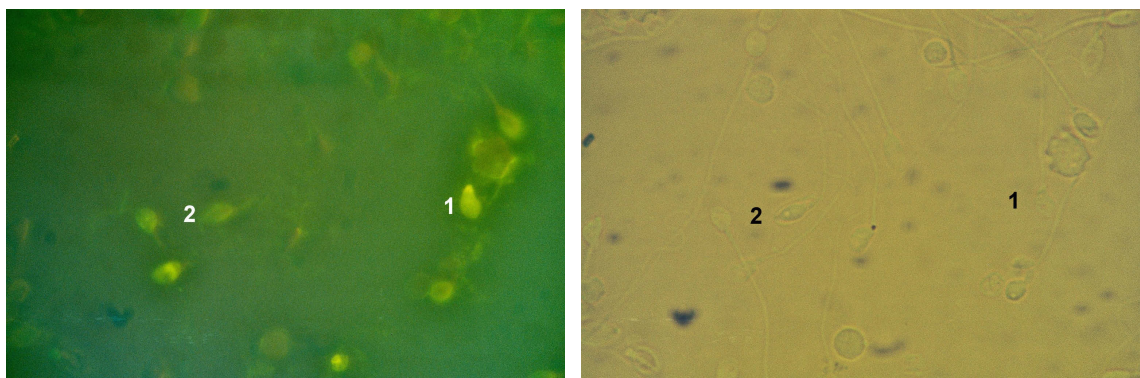
4.7 Testosteron

Von diesen 34 Patienten wurde außerdem der freie Testosteronwert im Serum ermittelt. Dieser lag zwischen Minimum 3,00 und Maximum 85,05 pmol/l.

4.8 Ergebnisse der Funktionstests

4.8.1 DNA- Fragmentation (TUNEL-Assay)

Der TUNEL-Assay wird genutzt, um das Maß der DNA-Fragmentation von Spermien zu bestimmen. Mit zunehmender DNA-Fragmentation werden mehr Bindungsstellen für den Fluoreszenzfarbstoff frei, und folglich erhöht sich das Ausmaß der Fluoreszenz. Die Abbildung 4.4 demonstriert das fluoreszenz- sowie das lichtmikroskopische Bild der TUNEL-Färbung. Das mit 1 beschriftete Spermium ist TUNEL-positiv, das mit 2 gekennzeichnete TUNEL-negativ.



(a) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung, Spermatozoen mit DNA-Fragmentation grün fluoreszierend (b) Lichtmikroskopische Darstellung des gleichen Ausstrichs

Abbildung 4.4: Fotodokumentation TUNEL-Assay

Im TUNEL-Assay zeigte sich im Nativejakulat zu 12% (Median) eine TUNEL-positive Reaktion, demgegenüber wiesen 37% der Swim-Up-Ausstriche eine DNA-Fragmentation auf, ersichtlich in Abbildung 4.5.

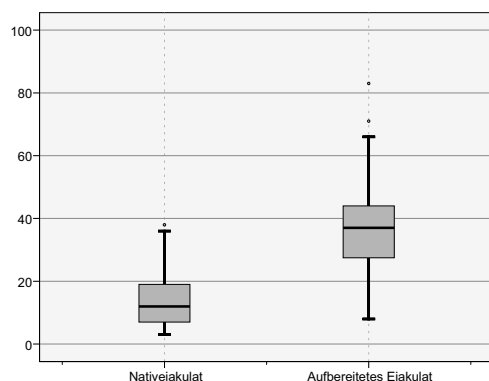


Abbildung 4.5: TUNEL-positive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung [%] ($p < 0,001^{**}$)

Zur genaueren Differenzierung der Ergebnisse erfolgte eine Auswertung entsprechend der Diagnosegruppen, welche anhand der Spermogrammbeurteilung ermittelt wurden. Die Abbildung 4.6 stellt diese Ergebnisse grafisch dar.

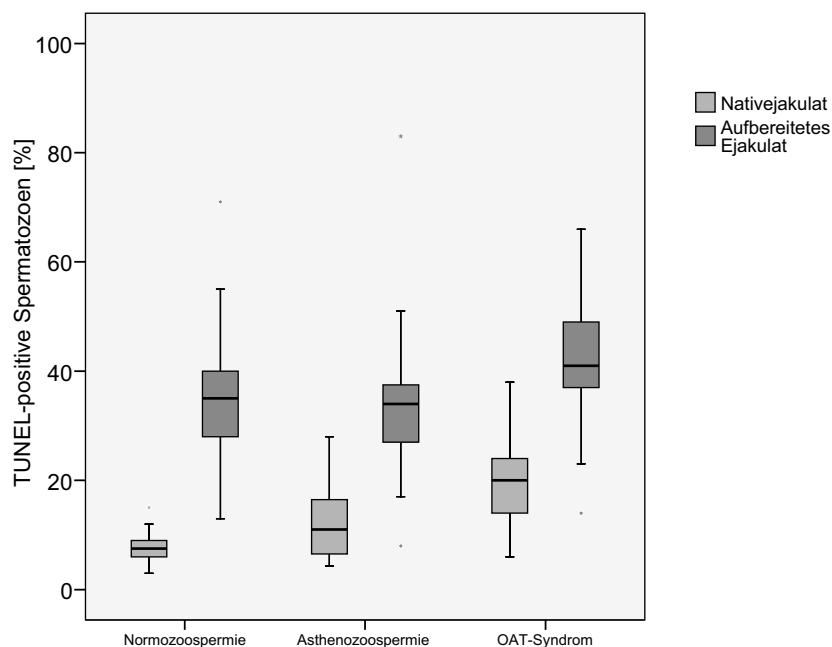


Abbildung 4.6: Ergebnisse der DNA-Fragmentation in den einzelnen Diagnosegruppen

Bei den Proben des Nativejakulates erhöhten sich Median, Maximalwert und Spannweite von der Gruppe der Normo- über die Astheno- hin zur Oligoasthenozoospermie. Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tabelle 4.3: Ergebnisse des TUNEL-Assays im Nativejakulat

	Normozoospermie	Asthenozoospermie	OAT-Syndrom
Median	7,5	11	20
Minimum	3	4	6
Maximum	15	28	38
Spannweite	12	24	32

Für die Mediane (Normozoospermie μ_1 , Asthenozoospermie μ_2 , Oligoasthenozoospermie μ_3) wurde ein signifikanter Unterschied wie folgt nachgewiesen:

Für den Test auf Gleichheit der Mediane zweier Diagnosegruppen wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle 4.4.

Tabelle 4.4: Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests (paarweise)

	p (Nativejakulat)	p (aufbereitetes Ejakulat)
$\mu_1 = \mu_2$	0,044	0,514
$\mu_2 = \mu_3$	0,001	0,006
$\mu_1 = \mu_3$	< 0,001	0,063

Für die globale Testhypothese $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet ($p < 0,001$). Das Bonferroni-Holm-Verfahren (Quednau 1992) lieferte $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. Es konnte somit ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Diagnosegruppen nachgewiesen werden.

Nach Aufbereitung fand ein Angleich der Mediane statt, er lag in der Gruppe der Normozoospermie bei 35%, in der Gruppe der Asthenozoospermie bei 34% und bei Patienten mit OAT-Syndrom bei 41%. Ebenfalls fiel die in allen drei Gruppen recht ausgeprägte Streuung der Werte im Vergleich zu den Resultaten des Nativejakulates auf.

In diesem Fall ergab der Kruskal-Wallis-Test für die globale Testhypothese $p=0,017$. Das Bonferroni-Holm-Verfahren lieferte hier einen signifikanten Unterschied der Mediane der Gruppen Asthenozoospermie und Oligoasthenozoospermie (d. h. $\mu_2 \neq \mu_3$).

4.8.2 Reaktive Sauerstoffspezies (DHE-Färbung)

Mit Hilfe der ROS-Färbung wird die intrazelluläre Produktion freier Sauerstoffradikale nachgewiesen. ROS-positive Spermien sind durch einen hohen Anteil von radikalen O_2 -Spezies gekennzeichnet.

Nach Aufbereitung fiel eine größere Spannweite (92%) im Vergleich zum Ergebnisbereich des Nativejakulates auf (74%). Der Median sank von 59,5% (Nativejakulat) auf 48% (Swim-Up-Probe). Dies veranschaulicht die Abbildung 4.7.

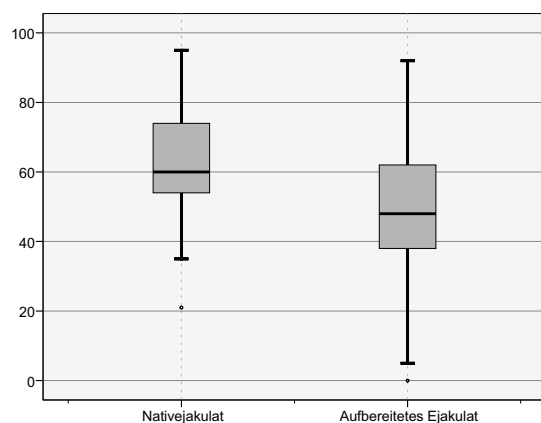


Abbildung 4.7: ROS-positive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung [%] ($p<0,001^{**}$)

Auch bei dieser Färbung wurde eine differenziertere Auswertung anhand der Subgruppierungen durchgeführt, wobei weder bei den Proben des Nativejakulates noch bei denen des mittels Swim-Up-Technik aufbereiteten Ejakulates signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen festgestellt werden konnten. Eine grafische Darstellung dieses Sachverhalts liefert die Abbildung 4.8.

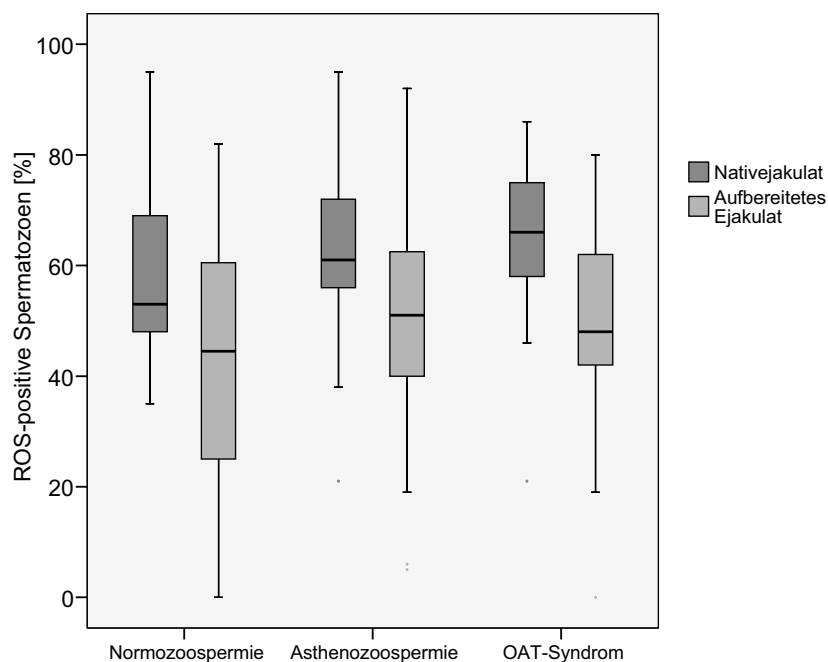


Abbildung 4.8: Ergebnisse der ROS-positiven Spermatozoen in den einzelnen Diagnosegruppen

4.8.3 Chromatinkondensation

4.8.3.1 Anilinblau

Eine vermehrte Anlagerung des Farbstoffes an Histone der Spermien-DNA signalisiert eine fehlerhafte Chromatinkondensation. Anilinpositive Spermatozoen haben einen zu hohen Anteil dieser Histone. Ein Wert von maximal 25% anilinpostiven Spermatozoen gilt noch als physiologisch (Dadoune et al. 1988). In der Abbildung 4.9 kommen Spermien verschiedener Kategorien der Anilinblaufärbung zur Darstellung. Das Spermium der Kategorie 0 ist ungefärbt, das der Kategorie 1 leicht gefärbt; beide werden als anilinnegativ zusammengefasst. Die beiden Spermien der Kategorie 3 weisen eine starke Blaufärbung auf und gelten als anilinpositiv. Die Kategorie 2, ebenfalls als anilinpositiv einzustufen, ist nicht abgebildet.

Der Anteil anilinpositiver Spermatozoen vor und nach Aufbereitung verringerte sich signifikant (Median nativ 46%, Swim-Up 39%; Ergebnisbereich nativ 5-83%, Swim-Up 5-76%; Spannweite nativ 78%, Swim-Up 71%), wie in Abbildung 4.10 visualisiert.

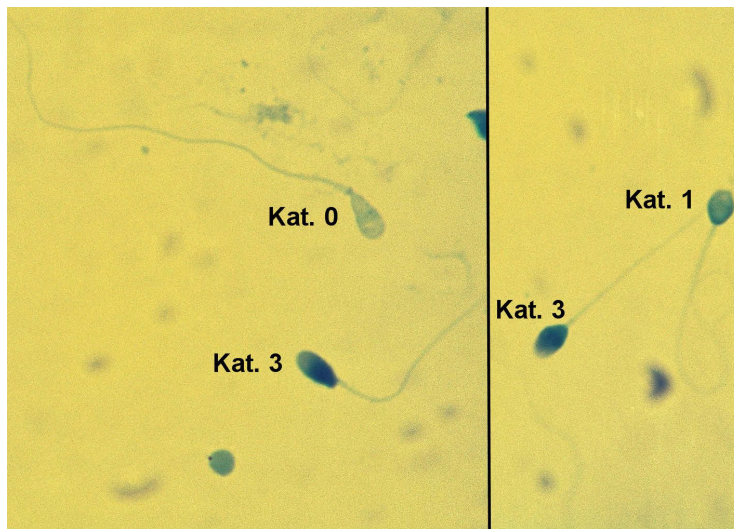


Abbildung 4.9: Mit Anilinblau gefärbte Spermien

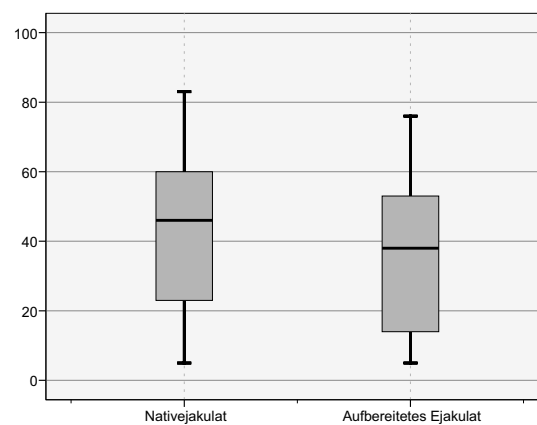


Abbildung 4.10: Anilinpositive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung [%] ($p < 0,013^{**}$)

Das Balkendiagramm in Abbildung 4.11 präsentiert die Verteilung anilinpositiver und anilinnegativer Proben. Der Anteil physiologischer Anilinblaufärbungen, d.h. innerhalb des vorgegebenen Bereiches von maximal 25% angefärbten Spermien, lag bei 20 von insgesamt 63 ausgewerteten Ausstrichen des Nativejakulates. Davon entfielen 6 von 16 Färbungen auf die Gruppe Normozoospermie, 9 von 28 Färbungen auf die Gruppe der Asthenozoospermie und 5 von 19 auf Färbungen von Patienten mit OAT-Syndrom. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Aufbereitung ermittelt.

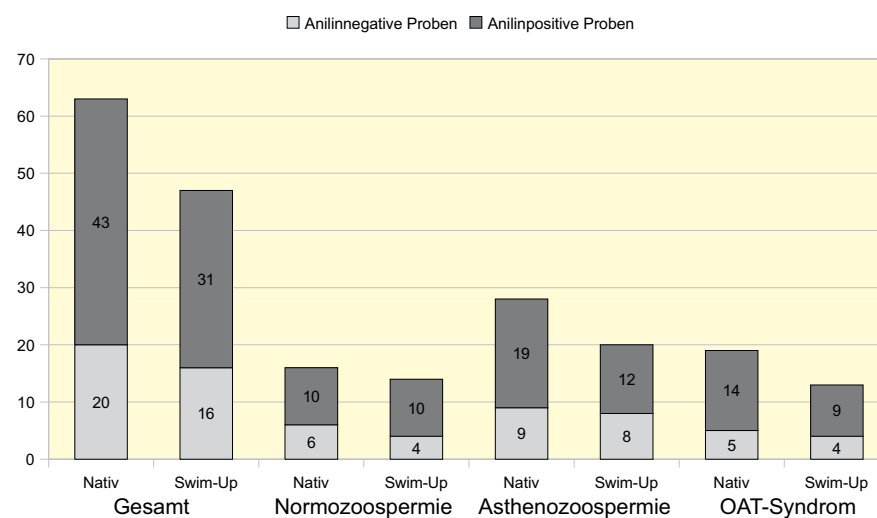


Abbildung 4.11: Anilinfärbung in den einzelnen Diagnosegruppen

4.8.3.2 Chromomycin A₃

Durch den Fluoreszenzfarbstoff Chromomycin A₃ angefärbte Spermien weisen einen Protaminmangel und damit eine pathologische Chromatinkondensation auf.

Die Ergebnisse der CMA₃-Färbung zeigten einen signifikanten Abfall des Anteils CMA₃-positiver Spermien nach Aufbereitung (Median nativ 27%, Swim-Up 20%; Ergebnisbereich nativ 6-71%, Swim-Up 2-50%), wie Abbildung 4.12 aufzeigt.

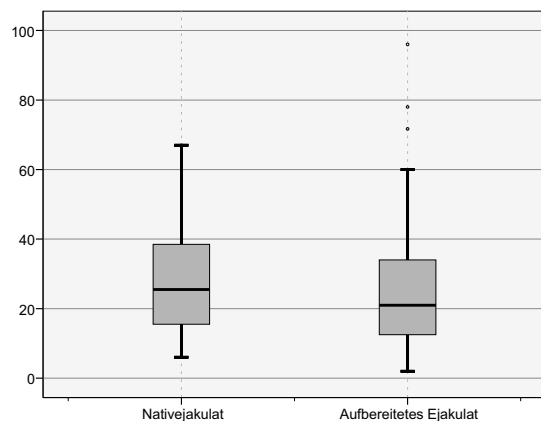


Abbildung 4.12: CMA₃-positive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung [%] ($p < 0,001^{**}$)

4.9 Korrelationen der Spermigrammparameter

Im Folgenden wurden die Spermigrammparameter inklusive Vitalität untereinander sowie zu den funktionellen Parametern in Zusammenhang gesetzt.

4.9.1 Dichte

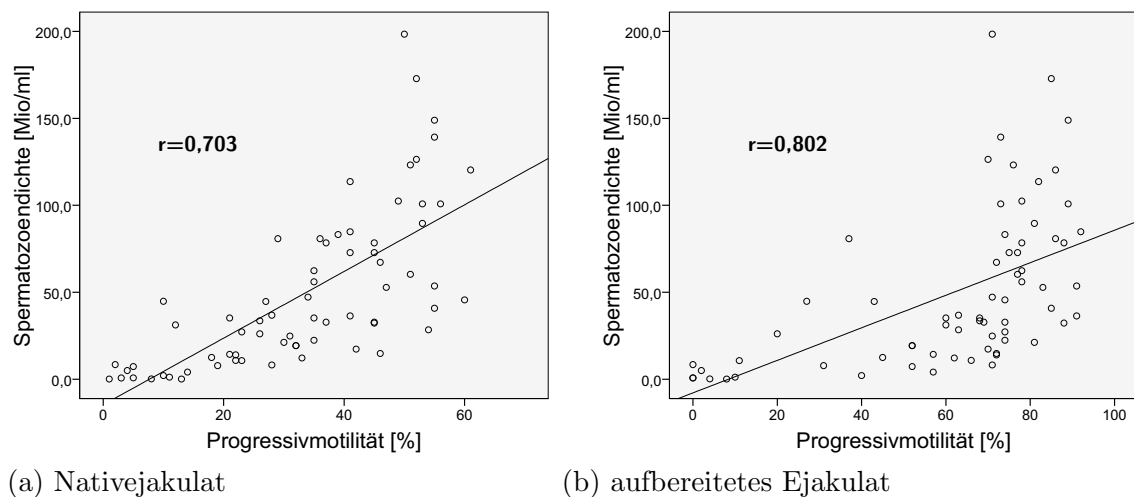
Durch Auszählung der Spermien in einer Zählkammer wird die Spermatozoendichte des Ejakulates im Rahmen des Basisspermigramms ermittelt.

4.9.1.1 Der Zusammenhang von Dichte und Motilität

Stark positive lineare Zusammenhänge ergaben die Korrelation von Dichte und Progressivmotilität (WHO a+b) sowohl bei den Proben des Nativ- als auch des Swim-Up-Ejakulates. Im Gegensatz dazu korrelierte der Anteil immotiler Spermien (WHO d) negativ mit der Spermatozoendichte. Eine hohe Dichte ging einher mit einem hohen Anteil beweglicher bzw. progressiv beweglicher Spermien. Alle Zusammenhänge waren hochsignifikant. Die Tabelle 4.5 gibt die genauen Zahlenwerte wieder, die Abbildung 4.13 verdeutlicht die Zusammenhänge beispielhaft.

Tabelle 4.5: Zusammenhang von Spermatozoendichte und Kategorien der Motilität im Nativ- sowie im aufbereiteten Ejakulat

		r	p	N
Nativejakulat	WHO a	0,726	<0,001**	69
Nativejakulat	WHO a+b	0,703	<0,001**	69
Nativejakulat	WHO d	-0,585	<0,001**	69
Swim-Up	WHO a	0,804	<0,001**	57
Swim-Up	WHO a+b	0,802	<0,001**	57
Swim-Up	WHO d	-0,608	<0,001**	57

**Abbildung 4.13:** Zusammenhang von Spermatozoendichte und Progressivmotilität (WHO a+b)

4.9.1.2 Der Zusammenhang von Dichte und Vitalität

Die Dichte korrelierte hochsignifikant positiv mit der Vitalität ($r = 0,608$; $p < 0,001^{**}$; $N = 66$). Mit zunehmender Spermatozoendichte erhöhte sich also der Anteil lebender Spermien in der Probe. Dies ist grafisch dargestellt in Abbildung 4.14.

4.9.1.3 Der Zusammenhang von Dichte und TUNEL-Assay

Es resultierte ein indirekt proportionales Verhältnis von Dichte und TUNEL-positiven Spermien im Nativejakulat ($r = -0,514$; $p < 0,001^{**}$; $N = 69$), welches nach Aufarbeitung im Swim-Up-Präparat nicht mehr nachweisbar war. Wie Abbildung

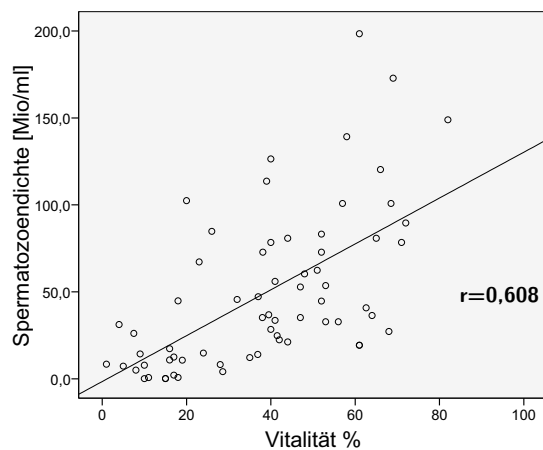


Abbildung 4.14: Zusammenhang von Spermatozoendichte und Vitalität

4.15 aufzeigt, ist die durch den TUNEL-Assay erfasste DNA-Fragmentation umso geringer, je mehr Spermien im Nativejakulat vorhanden sind.

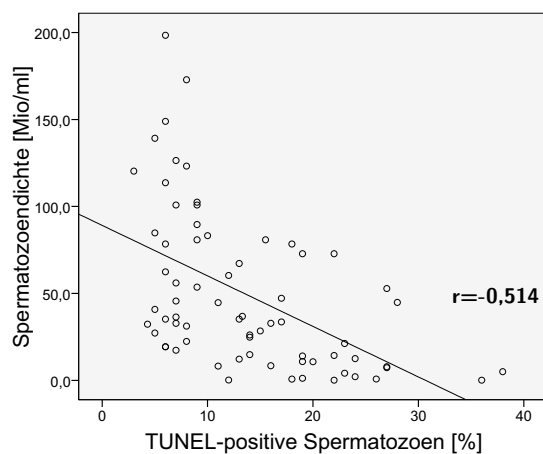


Abbildung 4.15: Zusammenhang von Spermatozoendichte und TUNEL-positiven Spermien im Nativejakulat

4.9.1.4 Der Zusammenhang von Dichte und ROS-produzierenden Spermien

Wurden einzelne Untergruppen zur Klassifikation ROS-produzierender Spermatozoen zusammengefasst, so ergaben sich positive Zusammenhänge zwischen der Spermindichte und den Spermien, die keine radikalen Sauerstoffspezies bilden. Im Umkehrschluss war die Korrelation der Dichte mit ROS-positiven Spermatozoen ne-

gativ ($r=-0,307$; $p=0,010^{**}$; $N=70$). Diese in Abbildung 4.16 präsentierten Zusammenhänge konnten nur bei den Proben des Nativejakulates nachgewiesen werden.

Unterschied man bei den sauerstoffradikalbildenden Spermatozoen zwischen solchen mit und ohne zytoplasmatischen Rest, konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden.

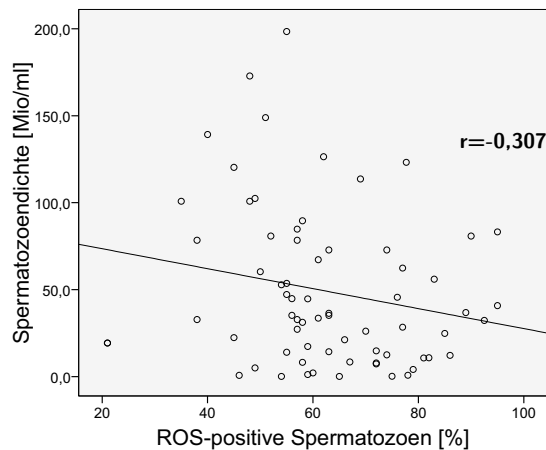


Abbildung 4.16: Zusammenhang von Spermatozoendichte und ROS-produzierenden Spermatozoen im Nativejakulat

4.9.2 Motilität

Die Motilität wird als Teil des Basisspermiogramms nach den Vorgaben des WHO-Laborhandbuches ermittelt.

Tabelle 4.6: Klassifikation der Spermienmotilität

WHO a:	schnelle progressive Beweglichkeit
WHO b:	langsame oder träge progressive Beweglichkeit
WHO c:	nichtprogressive Beweglichkeit
WHO d:	Immotilität

Zusätzlich zu dieser in Tabelle 4.6 angegebenen Einteilung fasst man Spermatozoen der Kategorien WHO a und b unter der Bezeichnung „Progressivmotilität“ zusammen, die Kategorien WHO a, b und c unter „Gesamtmotilität“.

Wie unter 4.9.4.2 genannt, konnte ein Zusammenhang zwischen Motilität und FSH festgestellt werden. Ferner korrelierte auch die Spermiedichte (4.9.1.1) mit verschiedenen Untergruppen der Motilität.

4.9.2.1 Der Zusammenhang von Motilität und TUNEL-Assay

Ein stark negativer Zusammenhang wurde zwischen der Progressivmotilität (d.h. WHO a+b) sowie der schnellen Progressivmotilität (d.h. WHO a) und den TUNEL-positiven Spermatozoen ermittelt. Das heißt, dass bei steigender DNA-Fragmentation, also hohem Anteil TUNEL-positiver Spermien, eine Verschlechterung der Motilität zu verzeichnen war. Am deutlichsten zeigte sich dies bei den Ergebnissen des Nativejakulates. In den Abbildungen 4.17 und 4.18 werden diese Zusammenhänge als Streudiagramme dargestellt, die Tabelle 4.7 fasst die Werte zusammen.

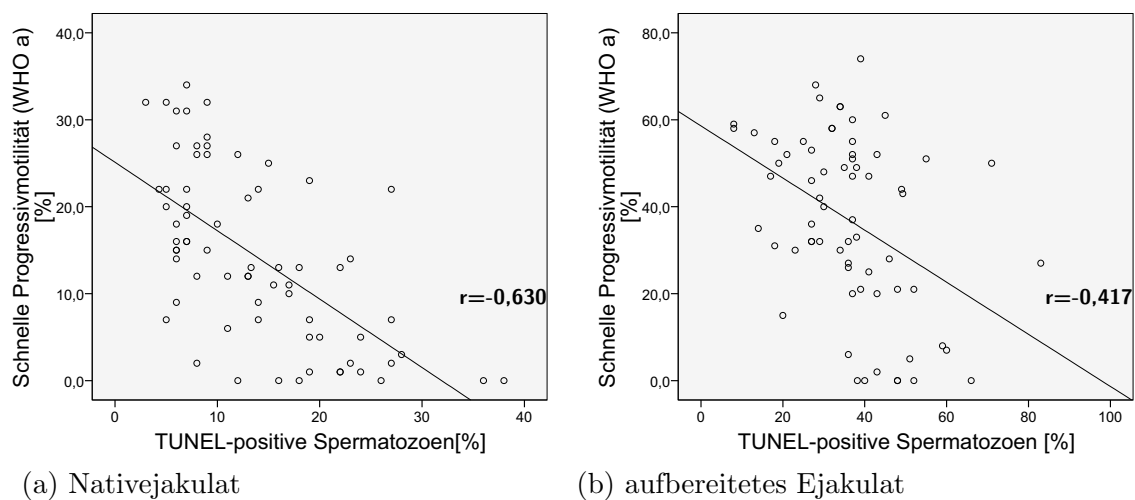


Abbildung 4.17: Zusammenhang von Spermien mit schneller Progressivmotilität (WHO a) und TUNEL-positiven Spermatozoen

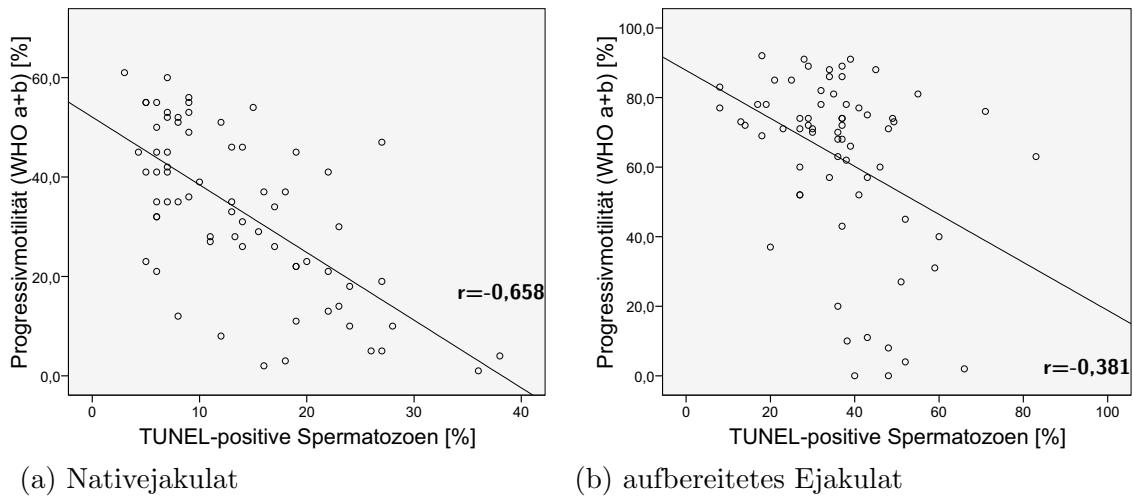


Abbildung 4.18: Zusammenhang von progressiv beweglichen Spermien (WHO a+b) und TUNEL-positiven Spermatozoen

Tabelle 4.7: Zusammenhang der Progressivmotilität sowie der schnellen Progressivmotilität im Nativejakulat mit TUNEL-positiven Spermatozoen (Nativ und Swim-Up)

		r	p	N
Nativejakulat	WHO a	-0,630	<0,001**	69
Nativejakulat	WHO a+b	-0,658	<0,001**	69
Swim-Up	WHO a	-0,417	<0,001**	67
Swim-Up	WHO a+b	-0,381	<0,001**	67

4.9.2.2 Der Zusammenhang von Motilität und Chromatinkondensation

Die Färbungen zur Chromatinkondensation (Anilinblau, Chromomycin A₃) wiesen verschiedene Zusammenhänge zur Motilität auf. Während keine Kategorie der Anilinblaufärbung eine Korrelation zur Motilität erkennen ließ, wurden statistisch signifikante Zusammenhänge der Spermatozoenbeweglichkeit mit dem Anteil CMA₃-positiver bzw. -negativer Spermien gefunden. Wie die folgenden Grafiken in Abbildung 4.19 und die Tabelle 4.8 verdeutlichen, ergab sich ein höherer Korrelationskoeffizient beim Zusammenfassen der Kategorien 0 und 1 der Chromomycin A₃ - Färbung im Vergleich zum Zusammenfassen der Kategorien 1 und 2.

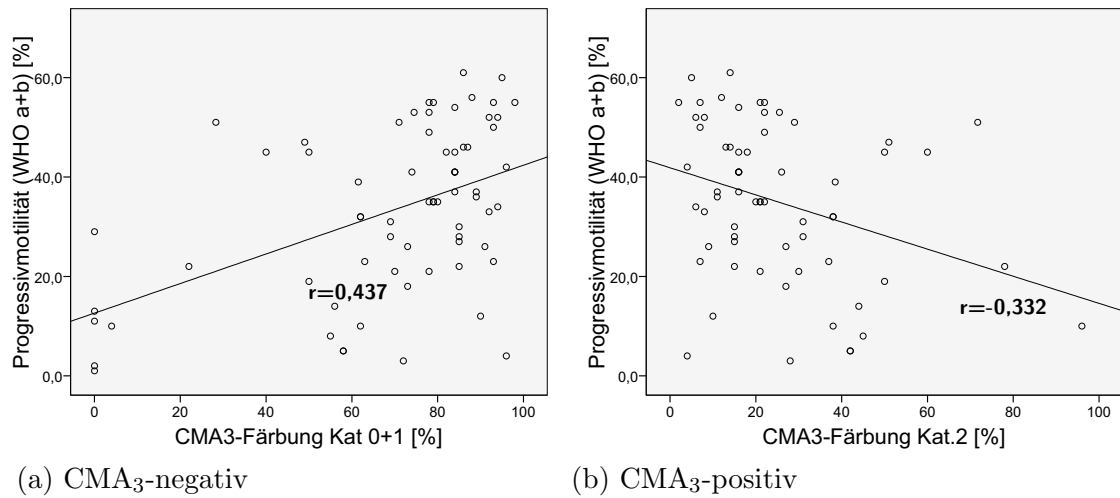


Abbildung 4.19: Zusammenhang der CMA₃-Färbung des aufbereiteten Ejakulates mit progressiv motilen Spermien (WHO a+b) des Nativejakulates

Tabelle 4.8: Zusammenhang der Progressivmotilität im Nativejakulat mit verschiedenen Untergruppen der CMA₃-Färbung

	r	p	N
CMA ₃ Kat. 0+1	0,437	<0,001**	69
CMA ₃ Kat. 2	-0,332	=0,007**	64
CMA ₃ Kat. 0	0,292	<0,019*	64
CMA ₃ Kat.1+2	-0,630	=0,609	69

4.9.3 Vitalität

Die Eosinfärbung markiert mittels Farbausschlussmethode avitale Spermatozoen.

4.9.3.1 Der Zusammenhang von Vitalität und TUNEL-Assay

Je höher der Anteil vitaler Spermien einer Probe, desto weniger Spermien zeigten eine DNA-Fragmentation. Die Abbildung 4.20 demonstriert diese sowohl im nativen als auch im aufbereiteten Ejakulat erhobenen Zusammenhänge. Beide Korrelationen waren statistisch hochsignifikant (nativ: $r = -0,612$; $p < 0,001^{**}$; $N = 66$; Swim-Up: $r = -0,414$; $p < 0,001^{**}$; $N = 65$).

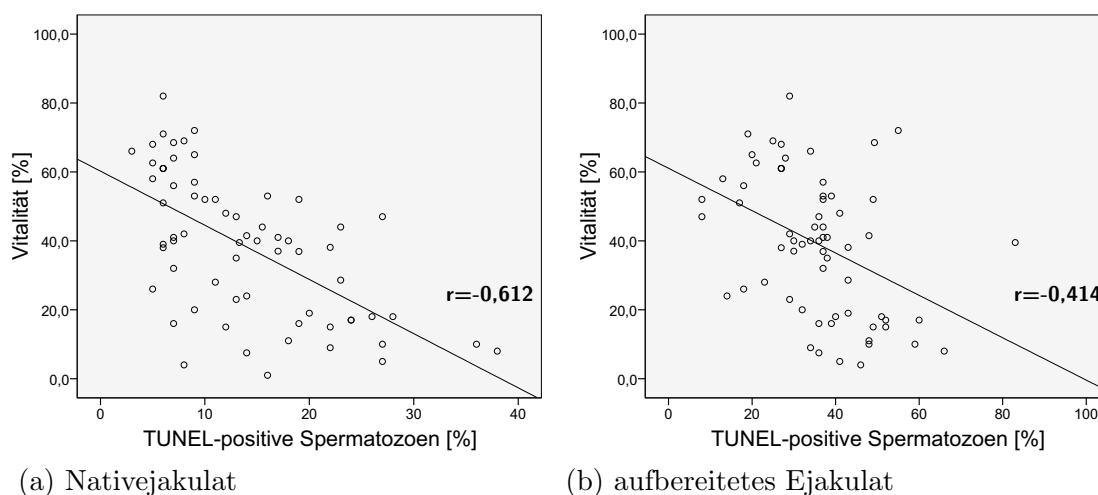


Abbildung 4.20: Zusammenhang von Vitalität und TUNEL-positiven Spermatozoen

4.9.3.2 Der Zusammenhang von Vitalität und ROS-Produktion

Differenzierte man bei der ROS-Färbung lediglich zwischen ROS-positiven und ROS-negativen Spermatozoen, ohne eine weitere Unterteilung in Spermien mit und ohne zytoplasmatischen Rest zu machen, so ergab sich eine signifikant negative Korrelation der ROS-positiven Spermien mit der Vitalität. Je mehr avitale Spermien in der Probe waren, desto größer war die Produktion radikaler Sauerstoffspezies. Dieser Zusammenhang konnte, ähnlich stark ausgeprägt, sowohl im nativen als auch im aufbereiteten Ejakulat (nativ: $r = -0,319$; $p = 0,009^{**}$; $N = 66$; Swim-Up: $r = -0,367$; $p = 0,002^{**}$; $N = 66$) abgeleitet werden. Die Grafiken der Abbildung 4.21 zeigen die beschriebenen Korrelationen.

4.9.3.3 Der Zusammenhang von Vitalität und Chromomycin A₃-Färbung

Während im Nativejakulat kein positiver Zusammenhang der Vitalität mit CMA₃-negativen Spermatozoen nachzuweisen war ($r = 0,038$; $p = 0,763$; $N = 65$), fand sich in der Swim-Up-Probe eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,134$; $p = 0,3$; $N = 62$) beider Werte. Grafisch dargestellt wird diese Beziehung in Abbildung 4.22.

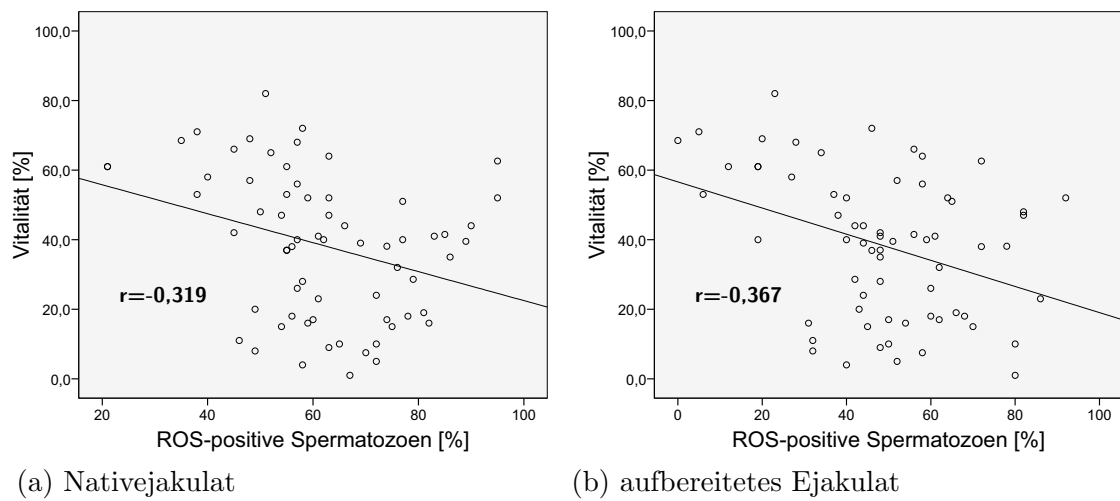


Abbildung 4.21: Zusammenhang von Vitalität und ROS-produzierenden Spermatozoen

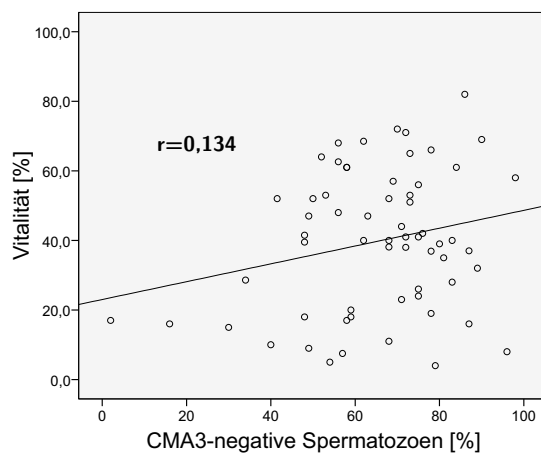


Abbildung 4.22: Zusammenhang von Vitalität mit CMA₃-negativen Spermatozoen im aufbereiteten Ejakulat

4.9.4 FSH

4.9.4.1 Der Zusammenhang von FSH und Dichte

Der FSH-Wert im Serum und die Spermatozoendichte waren im Nativejakulat negativ korreliert ($r = -0,365$; $p = 0,034^*$; $N = 34$), illustriert in Abbildung 4.23. Mit steigendem FSH-Wert sank die Anzahl von Spermien in der Probe.

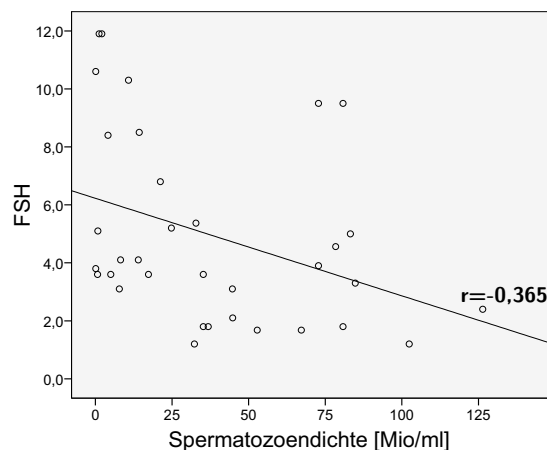


Abbildung 4.23: Zusammenhang von FSH i.S. und Spermatozoendichte

4.9.4.2 Der Zusammenhang von FSH und Motilität

Wie die Grafiken der Abbildung 4.24 darstellen, zeigte sich ein jeweils negativer Zusammenhang zwischen dem Hormon FSH im Serum und der Progressivmotilität (d.h. WHO a+b) sowie der schnellen Progressivmotilität (d.h. WHO a). Je höher der FSH-Wert im Serum, desto geringer war der Anteil progressiv beweglicher Spermien. Dieser Zusammenhang zur Spermatozoenbeweglichkeit ließ sich nur im nativen Ejakulat nachweisen. Die genauen Werte gibt die Tabelle 4.9 wieder.

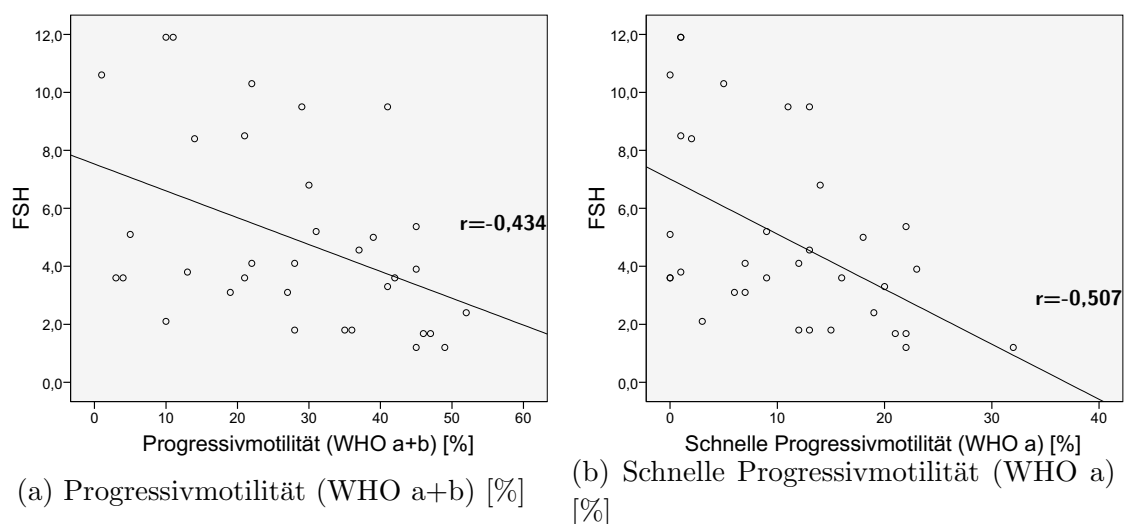


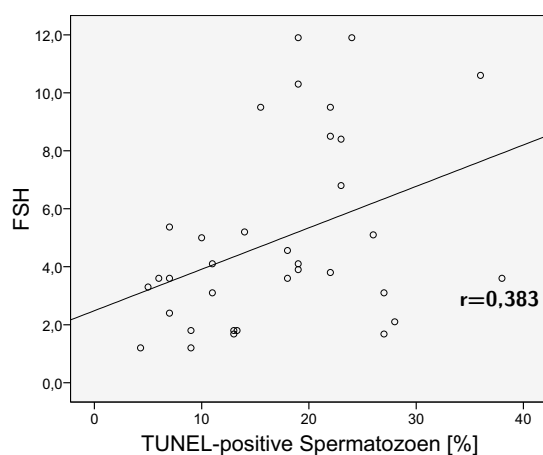
Abbildung 4.24: Zusammenhang von FSH i.S. und der Progressiv- (WHO a+b) sowie der schnellen Progressivmotilität (WHO a) im Nativejakulat

Tabelle 4.9: Zusammenhang von FSH i.S. und der Progressiv- (WHO a+b) sowie der schnellen Progressivmotilität (WHO a)

	r	p	N
WHO a+b	-0,434	=0,010*	34
WHO a	-0,507	=0,002**	34

4.9.4.3 Der Zusammenhang von FSH und TUNEL-Assay

Ein signifikant positiver Zusammenhang wurde zwischen dem FSH-Wert im Serum und dem Anteil TUNEL-positiver Spermien gefunden ($r = 0,383$; $p = 0,025^*$; $N = 34$). Der Anteil von Spermatozoen mit DNA-Fragmentation erhöhte sich also mit steigendem FSH-Wert, wie die Grafik 4.25 veranschaulicht. Auch dieser Zusammenhang ließ sich nur in der nativen Ejakulatprobe nachweisen.

**Abbildung 4.25:** Zusammenhang von FSH i.S. und TUNEL-positiven Spermatozoen im Nativejakulat

4.9.5 Testosteron

Im Gegensatz zum FSH war ein Zusammenhang vom freien Testosteron im Serum weder mit Spermogramm- noch mit Funktionsparametern feststellbar.

4.9.6 DNA-Fragmentation – TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay färbt die DNA-Fragmentation in Spermien an. Solche mit DNA-Fragmentation werden als TUNEL-positiv deklariert.

4.9.6.1 Der Zusammenhang der Ergebnisse des TUNEL-Assays vor und nach Aufbereitung

Beim Vergleich der Werte vor und nach Aufbereitung ergab sich eine hochsignifikante Korrelation der Ergebnisse des TUNEL-Assays. Bei allen hier untersuchten Proben kam es nach Ejakulataufbereitung mittels Swim-Up-Technik zur Zunahme des Anteils DNA-fragmentierter Spermien ($r = 0,374$; $p = 0,002^{**}$; $N = 68$). Dies visualisiert die Abbildung 4.26.

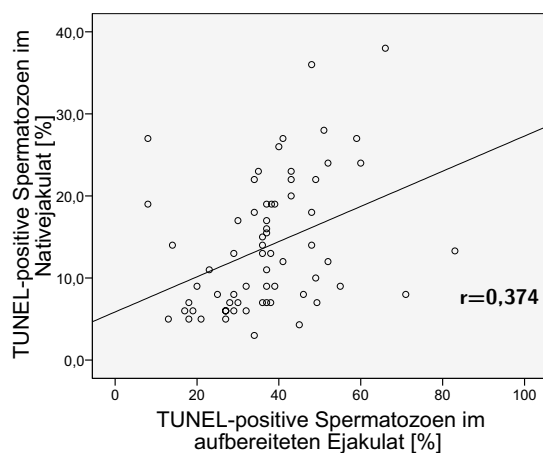


Abbildung 4.26: Zusammenhang von TUNEL-positiven Spermatozoen im Nativejakulat und im aufbereitetem Ejakulat

4.9.6.2 Der Zusammenhang von TUNEL-Assay und ROS-Produktion

Zu den Untergruppen der ROS-Färbung zeigte der TUNEL-Assay keinerlei Korrelationen.

4.9.6.3 Der Zusammenhang von TUNEL-Assay und Chromomycin A₃-Färbung

Verfährt man analog zu 4.9.2.2 und setzt TUNEL-positive Spermien des Nativejakulates mit den einzelnen Untergruppen der Chromomycin A₃ - Färbung in Zu-

sammenhang, so war dieser stärker, wenn man die Kategorie 1 zu den CMA₃ - negativen Spermien hinzuzählte. Im Gegensatz dazu verstärkte sich die positive bzw. negative Korrelation und wurde sogar hochsignifikant, bei Korrelation der TUNEL-positiven Spermien des aufbereiteten Ejakulates mit den Kategorien 0 bzw. 1 und 2 der CMA₃ - Färbung (Swim-Up). Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Tabellen 4.10 und 4.11 dargestellt.

Tabelle 4.10: Zusammenhang der TUNEL-positiven Spermatozoen (Nativejakulat) mit verschiedenen Untergruppen der CMA₃-Färbung (nach Swim-Up)

	r	p	N
CMA ₃ Kat. 0+1	-0,272	<0,028*	65
CMA ₃ Kat. 2	0,274	=0,027*	65
CMA ₃ Kat. 0	-0,239	<0,057	64
CMA ₃ Kat.1+2	0,256	=0,039*	65

Tabelle 4.11: Zusammenhang der TUNEL-positiven Spermatozoen (nach Swim-Up) mit verschiedenen Untergruppen der CMA₃-Färbung (nach Swim-Up)

	r	p	N
CMA ₃ Kat. 0+1	-0,296	<0,017*	65
CMA ₃ Kat. 2	0,298	=0,016*	65
CMA ₃ Kat. 0	-0,381	<0,002**	64
CMA ₃ Kat.1+2	0,294	=0,015*	65

4.9.7 Dihydroethidium - ROS-Färbung

Mit Hilfe der ROS-Färbung wird die intrazelluläre Produktion freier Sauerstoffradikale nachgewiesen.

4.9.7.1 Der Zusammenhang von ROS-Färbung und Spermioigrammparametern

Wie unter 4.9.1.4 präsentiert, existierte eine signifikant negative Korrelationen zwischen Spermindichte und der Produktion von Sauerstoffradikalen durch die Spermien.

Ebenfalls negativ korreliert waren der Anteil lebender Spermien in der Ejakulatprobe mit der ROS-Produktion, zu finden unter 4.9.3.2.

4.9.7.2 Der Zusammenhang von ROS-Färbung und Färbungen zur Chromatinkondensation

Korrelationen der Dihydroethidiumfärbung mit der Anilinblaufärbung ergaben in den einzelnen Untergruppen ein uneinheitliches Bild.

Im Gegensatz dazu zeigten sich deutlichere Tendenzen in Bezug auf die Chromomycin A₃ - Färbung. So korrelierten - bis auf eine Ausnahme - alle ROS-Kategorien, bei denen Nativejakulat bearbeitet wurde, mit der CMA₃-Färbung (nativ und aufbereitet). Dabei fand sich ein signifikanter, teilweise sogar hochsignifikant positiver Zusammenhang von ROS-positiven und CMA₃-positiven Spermien. Mit steigendem Anteil der Sauerstoffradikalproduktion in den Spermatozoen stieg auch der Anteil fehlerhafter Chromatinkondensation. Die genauen Werte zeigt die folgende Tabelle 4.12, die fett markierten Zusammenhänge sind grafisch in der Abbildung 4.27 dargestellt.

Tabelle 4.12: Zusammenhang von ROS-positiven Spermatozoen (Nativejakulat) mit verschiedenen Untergruppen der CMA₃-Färbung

	r	p	N
CMA₃ Kat. 0 Nativ	-0,247	0,042*	68
CMA₃ Kat. 0 Swim-Up	-0,352	0,004**	64
CMA ₃ Kat. 1 Nativ	0,290	0,017*	68
CMA ₃ Kat. 1 Swim-Up	0,286	0,022*	64
CMA₃ Kat. 2 Nativ	0,137	0,264	68
CMA₃ Kat. 2 Swim-Up	0,282	0,024*	64
CMA ₃ Kat. 0+1 Nativ	-0,130	0,286	69
CMA ₃ Kat. 0+1 Swim-Up	-0,284	0,018*	69
CMA ₃ Kat. 1+2 Nativ	0,233	0,055	69
CMA ₃ Kat. 1+2 Swim-Up	0,268	0,026*	69

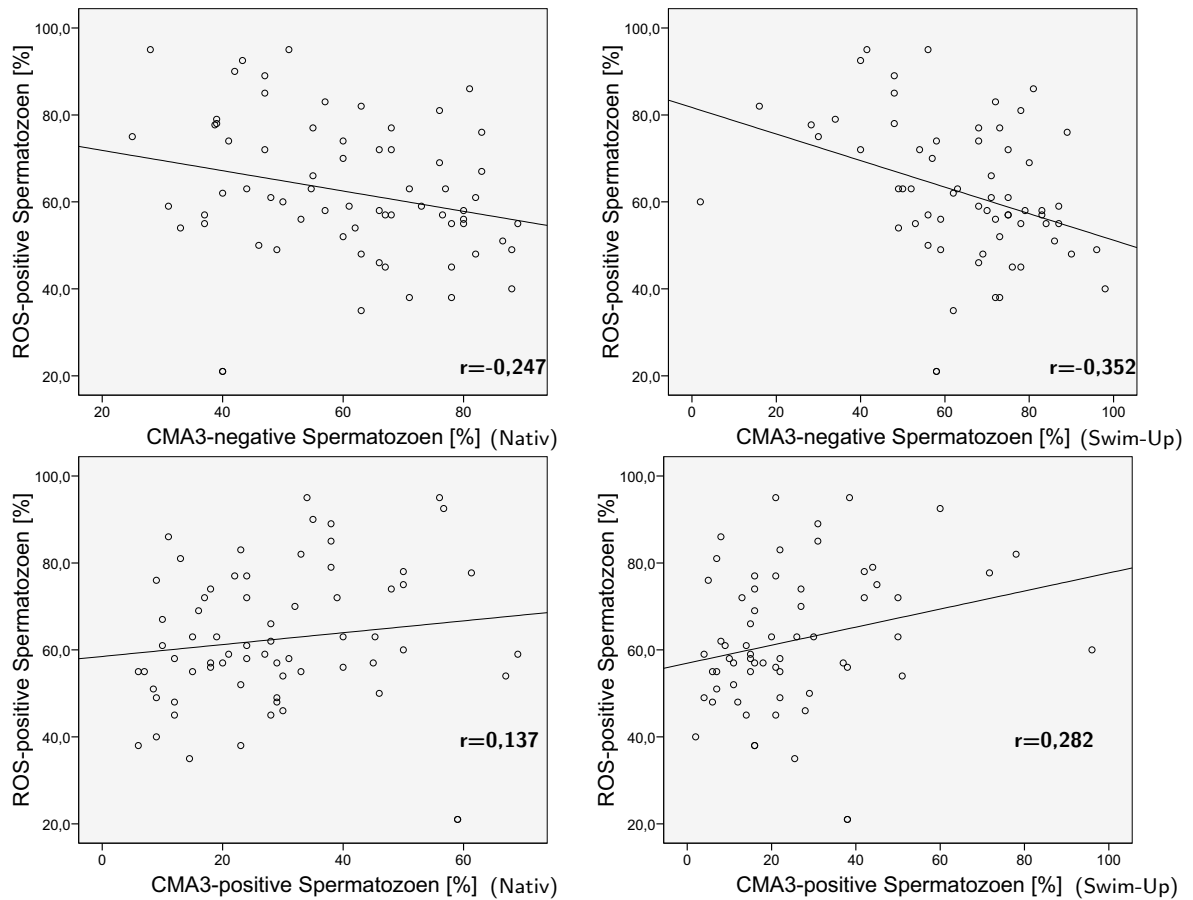


Abbildung 4.27: Zusammenhang von ROS-positiven Spermatozoen (Nativejakulat) mit verschiedenen Untergruppen der CMA₃-Färbung

4.9.8 Chromatinkondensation I – Anilinblaufärbung

Die Ergebnisse der Anilinblaufärbung zeigten weder Zusammenhänge zu den mittels Spermogramm erhobenen Daten noch zu den funktionellen Spermatozoenparametern. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen den beiden Färbungen zur Erfassung der Chromatinkondensation, Anilinblau und Chromomycin A₃, gefunden werden. Dies gilt sowohl für die Resultate des Nativejakulats als auch des aufbereiteten Ejakulats.

4.9.9 Chromatinkondensation II – Chromomycin A₃-Färbung

Wie unter 3.7.4 erwähnt, wurde zusätzlich zu der bereits in der Literatur publizierten Einteilung in chromomycin A₃-positive (d.h. Kategorie 2) und chromomycin A₃-

negative (d.h. Kategorie 0) Spermatozoen eine dritte Gruppe, Kategorie 1, evaluiert. Im Rahmen der statistischen Auswertung brachte jedoch die Unterscheidung von drei Färbestufen im Vergleich zu zwei keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn. Daher wurde im folgenden nur zwischen chromomycin A₃-positiven und chromomycin A₃-negativen Spermien unterschieden.

Die am Nativejakulat erhobenen Werte der Chromomycin A₃-Färbung zeigten keinerlei Zusammenhänge zu anderen Ergebnissen.

Nach Aufarbeitung mittels Swim-Up konnte ein hochsignifikant positiver Zusammenhang von chromomycin A₃-positiven zu TUNEL-positiven Spermien des Nativejakulats gefunden werden ($r = 0,274$; $p = 0,027^*$; $N = 65$). Dargestellt wurde dieser Zusammenhang bereits unter 4.9.6.3. Eine fehlerhafte Chromatinkondensation in Form eines Protaminmangels, nachgewiesen durch verstärkte Anfärbbarkeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff Chromomycin A₃, ging also einher mit einer erhöhten Anzahl von DNA-Strangbrüchen.

Ebenso konnte eine signifikante Korrelation von chromomycin A₃-positiven Spermien in der aufbereiteten Probe zu ROS-positiven Spermien des Nativejakulats gefunden werden ($r = 0,282$; $p = 0,024^*$; $N = 64$), wie unter 4.9.7.2 erläutert. Dies demonstriert einen Zusammenhang von erhöhter Produktion freier Sauerstoffradikale zu Schäden der Chromatinkondensation.

Signifikant bzw. hochsignifikant negative Korrelationen kennzeichnen die Beziehung des Spermioigrammparameters Motilität zu chromomycin A₃-positiven Spermien. Eine ausführliche Darstellung dazu findet sich unter 4.9.2.2.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Klassische SpermioGrammparameter vor und nach Aufarbeitung

Die Grundlage einer Ejakulatuntersuchung ist die Erhebung eines SpermioGramms nach den Vorgaben der WHO (Bals-Pratsch et al. 1999). Dabei gelten als klassische Spermatozoenparameter die Spermienkonzentration, die Motilität und die Morphologie. Zusammenhänge dieser Parameter wurden sowohl für die natürliche Befruchtung (Bonde et al. 1998) als auch für Befruchtungen im Rahmen der Assistierte Reproduktion gefunden (Enginsu et al. 1992, Geyter et al. 1992, Joshi et al. 1996, Donnelly et al. 1998, Sallam et al. 2003).

Basierend auf den Ergebnissen des BasisspermioGramms wurden die Patienten unserer Studie den einzelnen Diagnosegruppen zugeordnet. Insgesamt 16 Patienten zeigten in Bezug auf Spermindichte, -morphologie und -motilität normwertige Ergebnisse und konnten somit in die Gruppe der Normozoospermie eingegliedert werden, 31 Proben entsprachen dem Bild einer Asthenozoospermie, und bei 22 Patienten lag ein OAT-Syndrom vor. Ein Patient mit isolierter Oligozoospermie wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Alle Ejakulatproben wurden mittels der Swim-Up-Technik präpariert, so dass von jedem Patienten jeweils ein Nativejakulat und ein aufgearbeitetes Ejakulat untersucht wurde. Dabei wurde eine modifizierte Swim-Up-Methodik angewandt. Dies bedeutet, dass durch Verteilen des Nativejakulats auf vier Röhrchen und Schrägstellung

derselben ein Maximum an Oberfläche und damit auch an Zellausbeute erreicht wird. Zweck der Aufarbeitung ist, eine möglichst hohe Anzahl an progressiv beweglichen und damit auch morphologisch normalen Spermatozoen auszuwählen. Außerdem wird auch im Rahmen der primären Diagnostik bereits eine Aufarbeitung durchgeführt, um Aussagen bezüglich einer eventuell noch anstehenden Therapie im Sinne einer IVF oder ICSI treffen zu können.

Durch Selektion der beweglichen Spermien verringerte sich die Dichte nach der Spermienaufarbeitung in allen drei evaluierten Gruppen, am deutlichsten jedoch in der Diagnosegruppe „OAT-Syndrom“. Während bei initial normwertigen Spermigramm-ergebnissen, d.h. Proben der Diagnosegruppe „Normozoospermie“, die Zelldichte von 101,6 Millionen Spermien je Milliliter Ejakulat im Median auf 57,2 Mio/ml absinkt, erfährt die Gruppe der Asthenozoospermie einen Abfall von 40,55 Mio/ml auf 15,55 Mio/ml und die des OAT-Syndroms von 10,7 Mio/ml auf 2,4 Mio/ml. Dies bedeutet, dass bei Diagnose einer Normozoospermie rund 56% der Spermien des Nativejakulates durch Aufarbeitung ausgewählt werden, bei einer Asthenozoospermie 38% und bei Vorliegen eines OAT-Syndroms 22%. Da durch die Swim-Up-Technik primär motile von amotilen Spermien getrennt werden, ist die Zellausbeute bei einem normalen bis hohen Prozentsatz beweglicher Spermien größer. Scheinbar spielen aber auch noch andere Faktoren eine Rolle, denn in der Gruppe der Asthenozoospermie wurde die Spermatozoendichte durch die Aufarbeitung in etwa halbiert, während bei Ejakulaten mit Oligoasthenoteratozoospermie die Dichte auf ein Viertel des Ausgangswertes absank. Dabei ist zu bedenken, dass eine hohe Zelldichte zu einem größeren Pellet nach Zentrifugation führt. Dadurch werden mehr Spermien daran gehindert, das über ihnen befindliche Medium zu erreichen, da sie andere auf ihnen lagernde Zellen daran hindern (Henkel und Schill 2003). Ausgehend von diesen Überlegungen ist eine hohe Spermatozoen- bzw. Zelldichte durchaus ein dämpfender Faktor in Bezug auf die Gesamtzellausbeute nach Swim-Up. Aus diesem Grund wird in der Universitätsfrauenklinik in Jena der modifizierte Swim-Up durchgeführt (Hoppe und Starker 1995).

Auch in Bezug auf die Motilität bietet eine Normozoospermie im Ausgangsbefund die beste Voraussetzung für eine hohe Zahl an Spermien nach Präparation. Während der Median der Progressivmotilität nach Spermienpräparation sowohl bei Normozoospermie als auch bei Asthenozoospermie über 70% liegt, erreichen die Proben beim OAT-Syndrom lediglich Werte von 45%.

5.2 Der Einfluss der Aufarbeitung auf funktionelle Spermatozoenparameter

Wie in Abschnitt 1.2.1 dargestellt, dienen Spermienpräparationstechniken dem Zweck, die am besten geeigneten Spermatozoen für die nachfolgende Befruchtungsprozedur zu separieren. Abgesehen von einer gezielten Selektion von normomorphen und motilen Spermien erhofft man so auch eine Anreicherung von Keimzellen mit intakter Chromatinstruktur, da diese die Wahrscheinlichkeit einer Fertilisation und nachfolgender Schwangerschaft erhöht (Evenson DP 2008).

So fanden Spano et. al. (Spano et al. 1999) in ihrer Untersuchung eine generelle Verbesserung der Kernreife („nuclear maturity“) nach klassischer Swim-Up-Prozedur mit einem Zentrifugationsschritt.

Durch zunehmende Diskussionen über die Schädigung von Spermien durch radikale Sauerstoffspezies wurden auch erneut Aufarbeitungstechniken und ihr Einfluss auf die DNA-Struktur der Spermien erörtert. In Bezug auf die Swim-Up-Technik nehmen einige Autoren an, dass durch die Zentrifugation der Kontakt der Spermatozoen mit potentiell schädlichen Radikalen, wie zum Beispiel Leukozyten und den von ihnen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies, intensiviert wird und so auch das Ausmaß an Schädigungen zunimmt (Agarwal et al. 1994, Alvarez et al. 1993, Mortimer 1991). Ferner sind durch Oxidation entstandene Schäden an der Spermienmembran und nachfolgend auch der DNA durch das Entfernen des Seminalplasmas und der darin enthaltenen antioxidativen Substanzen begünstigt (Twigg et al. 1998). Die Untersuchungen von Younglai (Younglai et al. 2001) dienten der Beantwortung der Frage, ob tatsächlich die Zentrifugation des Ejakulats ausschlaggebend für zu-

mindest einen Teil der DNA-Schäden ist. Daher verglich er die Prozentzahl fragmentierter Spermien, gemessen durch den TUNEL-Assay, zum einen nach klassischem Swim-Up und zum anderen nach direkter Swim-Up-Technik unter Auslassung des Zentrifugationsschritts. Dabei fand er im Nativejakulat im Median 2,36% Spermien mit fragmentierter DNA, nach klassischer Swim-Up-Aufbereitung 1,08% und nach direktem Swim-Up ohne Zentrifugationsschritt 1,78% TUNEL-positive Spermien, also solche mit DNA-Strangbrüchen. Zwar konnte er keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den drei verschiedenen Proben finden, allerdings wurden auch lediglich 16 Proben evaluiert.

Als geeignetes Verfahren zur Isolierung von Spermien mit intakter DNA und, damit in Zusammenhang stehend, korrekt kondensierter Erbinformation, wird die Methodik der Glaswollfiltration genannt. Henkel (Henkel et al. 1994) demonstrierte mit seinen Ergebnissen, dass der Anteil chromatinkondensierter Spermien am höchsten nach Präparation des Ejakulats mittels Glaswollfiltration ist, verglichen mit Aufarbeitung durch Swim-Up. Zur Erfassung des Chromatinstatus nutzte er die Anilinblaufärbung und verglich den Anteil anilinpositiver Spermien im Nativejakulat mit dem nach Aufarbeitung, wobei er zwei verschiedene Aufarbeitungsprozeduren nutzte, den Swim-Up und die Glaswollfiltration. Er fand den größten Anteil ungefärbter und damit chromatinkondensierter Spermien nach Glaswollfiltration und resümierte daher, dass diese Methodik der Spermioseparation überlegen ist in der Anreicherung normaler chromatinkondensierter menschlicher Spermatozoen.

Doch auch nach Swim-Up wurden Verbesserungen des DNA-Status der separierten Spermien im Vergleich zu den Ergebnissen des Nativejakulats gefunden. So fand Piomboni (Piomboni et al. 2006) einen signifikanten Abfall des Prozentsatzes DNA-fragmentierter Spermien nach Swim-Up.

Unsere Untersuchungen hingegen ergaben bei allen Proben nach Aufbereitung mittels Swim-Up-Technik einen Anstieg der durch den TUNEL-Assay erfassten DNA-Fragmentation. Der Median von 12% Tunel-positiven Spermatozoen, d.h. Spermien mit fragmentierter DNA, im Nativejakulat erhöhte sich auf 37% in der aufbereiteten

Probe.

Dabei ist zu bedenken, dass die Aufbereitung in erster Linie motile Spermien selektiert. Dies bestätigen auch unsere Ergebnisse, indem sich der Median der Progressivmotilität in allen von uns gebildeten Diagnosegruppen signifikant verbesserte, wie es unter 4.2 dargestellt wird. Die Progressivmotilität der Spermien wiederum korreliert sowohl im Nativejakulat als auch im aufbereiteten Ejakulat hochsignifikant negativ mit dem Prozentsatz der DNA-fragmentierten Spermien. Zu erwarten wäre daher bei der Verbesserung der Werte der Motilität auch eine Verringerung der Anzahl von DNA-fragmentierten Spermien.

Die Ursache dieser Diskrepanz bleibt noch unklar. Es besteht also die Frage, weshalb es in ausnahmslos jeder von uns untersuchten Probe nach Aufarbeitung zu einer erhöhten Anzahl von DNA-Strangbrüchen kommt. Als eine mögliche Ursache für den hohen Level an DNA-fragmentierten Spermien muss die Aufbereitungsprozedur gesehen werden. Auch methodische Fehler müssen in Betracht gezogen werden. Dies vor allem, da die mit der DNA-Fragmentation negativ korrelierte Spermienmotilität durch die Präparationstechnik des Swim-Up deutlich verbessert wird.

Die Untersuchung von Ramos (Ramos und Wetzels 2001) hat konträr zu unseren Ergebnissen gezeigt, dass bei einzeln ausgewählten motilen Spermien nur ein verschwindend geringer Anteil von 0,5% DNA-Fragmentation gefunden wird. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden durch den Swim-Up motile Spermien selektiert, die Rate an Strangbrüchen jedoch hat deutlich von im Mittel 12% im nativen Ejakulat auf 37% im aufgearbeiteten zugenommen.

Außerdem ist bei den Werten der TUNEL-positiven Spermatozoen nach Aufarbeitung eine Annäherung der Ergebnisse auf ein ähnliches Niveau in allen drei Diagnosegruppen auffällig. Während in der nicht aufbereiteten Ejakulatprobe in der Diagnosegruppe der Normozoospermie der mediane Prozentsatz DNA-fragmentierter Spermien bei 7,5 % liegt, steigt er bei der Asthenozoospermie auf 11% an und erreicht bei Vorliegen eines OAT-Syndroms Werte von 20%. Diese Unterschiede sind nach der Swim-Up-Prozedur nicht mehr nachweisbar.

In der Gruppe der Patienten mit Normozoospermie werden 35% Spermien mit

DNA-Fragmentation gefunden, in der der Asthenozoospermie 34% und beim OAT-Syndrom 41%.

Offensichtlich unabhängig vom Ausgangsbefund, welcher bei den Patienten mit Normozoospermie ein geringeres Ausmaß an DNA-Fragmentation aufweist als bei solchen mit OAT-Syndrom oder mit Asthenozoospermie, sind nach Durchführung des Swim-Up die Ergebnisbereiche ähnlich und die Mediane liegen dicht beieinander. Daher ist zu vermuten, dass die Verursachung der zunehmenden Anzahl an Strangbrüchen in den Zeitraum von Beginn der Swim-Up-Prozedur bis zur Beendigung des TUNEL-Assays fallen.

Hier bietet sich eine Ursachenforschung im Rahmen weitergehender Studien an, da die Spermienfunktion durch die DNA-Fragmentation eingeschränkt wird und auch die Fertilisationsraten bei In Vitro Fertilisationen abnehmen (Benchai et al. 2007). Ferner kann auch die weitere embryonale Entwicklung gestört sein (Sakkas et al. 1998, Ahmadi und Ng 1999) und schließlich zu einem erhöhten Abortrisiko führen. Dies unterstreicht die Relevanz dieser Forschungen.

5.3 Leukozyten, Radikale Sauerstoffspezies und DNA-Schäden

Das Vorhandensein von Leukozyten im Ejakulat ist vielfach diskutierter Gegenstand in zahlreichen Publikationen. Mehrheitlich wird davon ausgegangen, dass, zumindest bei Überschreiten eines Grenzwertes, die Präsenz dieser Zellen zu Schädigungen der Spermatozoen führen kann. Aktuell liegt dieser von der WHO vorgegebene Referenzwert bei einer Million Leukozyten pro Milliliter Ejakulat.

Die Debatte, ob dieser Wert möglicherweise zu hoch angesetzt ist, wird unter anderem von Henkel geführt. Er plädiert in seiner Veröffentlichung (Henkel et al. 2005a) für ein Absenken auf 0,5 Mio/ml, da er unter anderem die von den Leukozyten produzierten radikalen Sauerstoffspezies als eine Ursache für den Rückgang der Spermatozoenmotilität und der Integrität der Spermien-DNA sieht.

Leukozyten im Seminalplasma werden, wie in anderen Körperflüssigkeiten auch, als Hinweis auf eine vorhandene Entzündung gewertet. Vielfach verlaufen die Infektionen des männlichen Genitaltraktes symptomarm bzw. stumm, was die Diagnostik erschwert. So werden chronische Verläufe begünstigt, was wiederum zu einem längerfristigen Qualitätsverlust der Spermien führen kann.

Die von den Leukozyten verursachten Schäden gehen unter anderem von radikalen Sauerstoffspezies aus. Im Rahmen der körpereigenen Abwehr führt der Kontakt dieser Radikale mit Infektionserregern zur Oxidation der Bakterienmembran, wodurch diese zugrunde gehen. Der in diesem Zusammenhang nützliche bis überlebenswichtige Prozess kann jedoch bei Angriff auf andere Zellen auch große Schäden anrichten. Hierbei sind Spermien besonders gefährdet, da ihre Plasmamembran einen hohen Anteil an vielfach ungesättigten Fettsäuren enthält. Nur so ist die von den Spermien im Rahmen des Befruchtungs- und Verschmelzungsprozess mit der Eizelle benötigte Membranfluidität gewährleistet. Der Nachteil ist jedoch in der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Prozessen zu sehen. Nach Initiierung einer Radikalkettenreaktion ändert sich die Konsistenz der Spermienmembran, was wiederum Auswirkungen auf die Motilität (Saleh et al. 2002) hat. Aus dem resultierenden Verlust der Membranintegrität des Spermiums ergeben sich weitere Einschränkungen der Spermatozoenfunktion in Bezug auf Kapazitation, Oolemmaabbindungs- und -penetrationsfähigkeit. Wie Alvarez (Alvarez et al. 2002) in seiner Veröffentlichung demonstriert hat, wird auch die DNA der Spermien durch radikale Sauerstoffspezies angegriffen. Diese Ergebnisse werden durch Barroso bestätigt (Barroso et al. 2000). Reaktive Sauerstoffspezies können die DNA der Spermatozoen auf verschiedene Weise beschädigen: sie verursachen sowohl Strangbrüche, Oxidation von DNA-Basen, Querverbindungen des Chromatins als auch Austausch von Basenpaaren (Sharma et al. 2004).

Jedoch sind nicht alle Radikale, welche Spermien alterieren können, von Leukozyten verursacht. Wenngleich Leukozyten als die Hauptquelle für Sauerstoffradikale im Ejakulat angesehen werden (Whittington und Ford 1999, Henkel et al. 2003a), können auch die Spermatozoen selbst ROS produzieren.

Basierend auf der Beobachtung, dass morphologisch auffällige Spermatozoen, vor

allem solche mit Zytoplasmarest im Bereich des Mittelstücks, eine erhöhte ROS-Produktion aufweisen, wurde dieser Aspekt genauer untersucht. Enthalten Ejakulate eine erhöhte Anzahl dieser Spermien mit Zytoplasmaresiduen, so findet sich auch eine hohe Konzentration von Enzymen wie der Kreatinkinase oder der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (Gomez et al. 1996). Ähnlich wie die unter anderem von Leukozyten gebildeten extrinsischen ROS-Spezies bedrohen auch diese intrinsischen Sauerstoffradikale die Spermienintegrität und damit die Funktion und Fähigkeit, eine Eizelle zu befruchten.

Scheinbar ist die Bedrohung des Spermiengenoms durch solche innerhalb der Zelle gebildeten Radikale massiver. Während im Seminalplasma vorkommende oxidative Substanzen wie das Superoxid anion oder Hydroxylradikale aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit vorwiegend die Membran schädigen, werden intrazellulär produzierte ROS-Spezies vor allem für Schäden an der DNA verantwortlich gemacht. Dies wurde bereits durch Henkel bestätigt (Henkel et al. 2005a), wobei eine signifikant positive Korrelation zwischen der intrinsischen ROS-Produktion und dem Anteil TUNEL-positiver Spermien gefunden wurde.

Unsere Analysen konnten diesen Zusammenhang nicht herstellen. Weder die Anzahl ROS-positiver Spermien noch die der Leukozyten zeigten laut unseren Ergebnissen signifikante Beziehungen zur DNA-Fragmentation.

Dabei ist allerdings zu bedenken, dass bei unseren Untersuchungen die Detektion der Leukozyten durch Peroxidasefärbung erfolgte. Spezifischere Methoden, die Leukozyten mittels Antikörperreaktionen erfassen, weisen wesentlich höhere Werte der weißen Blutzellen im Ejakulat nach. So demonstrierte Henkel (Henkel et al. 2003b), dass die Peroxidasefärbung nur 47,7% der Leukozyten anfärbt, die durch CD45 identifiziert wurden. Diese Schwierigkeit, die genaue Zahl von Leukozyten im Ejakulat zu erfassen, erschwert auch die Einschätzung der Wertigkeit und letztlich das verbindliche Festlegen eines Grenzwertes.

5.4 Chromatinkondensation

Um genauere Aussagen über den Chromatinstatus der Spermatozoen treffen zu können, wurden in dieser Arbeit zwei Färbungen zur Evaluation der Chromatinkondensation angewendet.

Der saure Farbstoff Anilinblau bindet an basische Histone, welche normalerweise im Rahmen der Spermiogenese durch Protamine ausgetauscht werden. Eine erhöhte Anfärbbarkeit mit Anilinblau signalisiert also ein pathologisch erhöhtes Vorkommen der Histone im Spermiengenom, wobei der Referenzwert bei maximal 25% anilinpositiven Spermien liegt.

Im Gegensatz dazu weist die Chromomycin A₃ - Färbung ein Protamindefizit nach. Der Fluoreszenzfarbstoff besetzt diejenigen Bindungsstellen, welche nicht mit Protaminen gefüllt sind. Somit misst die Anilinblaufärbung einen Histon-Überschuss und die Chromomycin-Färbung einen Protaminmangel.

Aufgrund dieser theoretischen Grundlagen war zu vermuten, dass beide Färbungen einen positiven Zusammenhang aufweisen müssten, da grundsätzlich von einem Austausch der Histone gegen Protamine ausgegangen wird.

Das Zusammenspiel aller Schritte der menschlichen Spermiogenese ist selbstverständlich vielschichtiger. Dies mag der Grund für die von uns gefundenen Ergebnisse sein. Zwischen den beiden Färbungen Anilinblau und Chromomycin konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden.

Selbst das ebenfalls vereinfachte Prinzip des Zwei-Schritt-Mechanismus beim Austausch der Histone gegen die Protamine erlaubt den Verdacht, dass die von uns genutzten Färbungen zwei verschiedene Stadien der Spermienreifung kennzeichnen und daher nicht vergleichbar sind. Dieses Modell sagt aus, dass in einem ersten Schritt Histone gegen die sogenannten TNP's („transition nuclear proteins“) ausgewechselt werden und nachfolgend diese durch die Protamine. Man kann nicht direkt schlussfolgern, dass ein hoher Anteil an Histonen gleichzeitig ein Protamindefizit bedeutet. Dennoch konnte Zhang diese Aussage in seiner Arbeit nachweisen (Zhang et al.

2006), wobei er zur Detektion von Histonen und Protaminen Gel-Elektrophorese und Immunoblots nutzte.

Bei der Diskussion über das Vorhandensein und den Einfluss von Histonen auf die männliche Fertilität muss ebenfalls bedacht werden, dass es zu Modifikationen hinsichtlich einer Hyperazetylierung der Histone kommt. Dieses gemeinsam mit der Aktivität von Topoisomerasen führt zu einer Relaxation der DNA-Struktur und ebnet die weiteren Reifungsschritte bis hin zu einem hochkondensierten Spermiengenom. Das Entfernen der Histone und das Einsetzen der TNP's wird erleichtert (Oliva und Mezquita 1982) durch Methylieren und Phosphorylieren, eine Schlüsselposition nimmt die Hyperazetylierung des Histons H4 ein. Zusätzlich dazu vermindern die von der Topoisomerase gesetzten Strangbrüche die Drehbeanspruchung der DNA. Auch dies ist ein notwendiger und daher physiologischer Prozess im Zusammenhang mit der Kondensation der Spermatozoen-DNA. Die Strangbrüche sind nicht grundsätzlich als nachteilig anzusehen, da sie normalerweise wieder ligiert werden. Jedoch kann es bei Defekten der Topoisomerase zu einer pathologisch erhöhten Zahl von DNA-Brüchen kommen. So kann das gemeinsame Auftreten von DNA-Fragmentation und fehlerhafter Chromatinkondensation erklärt werden (Manicardi et al. 1995).

Entsprechend der Ergebnisse von Manicardi (Manicardi et al. 1995, Manicardi et al. 1998) können wir eine hochsignifikant positive Korrelation von CMA₃-positiven und TUNEL-positiven Spermatozoen bestätigen. Diese Verbindung von Brüchen und mangelhafter Kondensation der DNA lässt sich jedoch nur durch die Chromomycin-Färbung nachweisen, die Anilinblaufärbung hingegen ist laut unseren Untersuchungen zu dieser Schlussfolgerung nicht geeignet.

Auch in der aktuellen Literatur wird nicht von einem möglichen Zusammenhang der mittels Anilinblau detektierten fehlerhaften Chromatinkondensation und der mittels TUNEL-Assay nachgewiesenen DNA-Fragmentation berichtet.

In Bezug auf die Anilinblaufärbung ist weiterhin auffällig, dass in unseren Untersuchungen auch zu allen anderen Funktionstests sowie zu den Ergebnissen des Basisspermiogramms keinerlei Zusammenhänge gefunden werden konnten. Hammadeh

(Hammadah et al. 2001b) konnte in seinen Untersuchungen ebenfalls keine Korrelationen finden zwischen der Chromatinkondensation, gemessen anhand der Anilinblaufärbung, und Spermatozoenmorphologie, -dichte oder -motilität. Er schloss daraus, dass die Chromatinkondensation vollkommen unabhängig von den konventionellen Spermienparametern ist und daher auch in die Routine der andrologischen Laboratorien aufgenommen werden sollte. Dies auch, da Hammadah in einer früheren Untersuchung (Hammadah et al. 1998) publiziert hat, dass Spermien mit erhöhter Anfärbbarkeit für Anilinblau und damit unvollständiger bzw. fehlerhafter Chromatinkondensation zur einer erniedrigten Fertilisations- und Schwangerschaftsrate nach IVF führen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die in unserer Untersuchung gemessene Verteilung anilinpositiver und anilinnegativer Ejakulatproben, bezogen auf Färbungen des Nativejakulats, in den einzelnen Diagnosegruppen. Die Gesamtheit aller Proben ergibt eine Zahl von 20 anilinnegativen Ausstrichen bei insgesamt 63 evaluierten Objektträgern. Hier zeigt sich also ein Verhältnis von circa einem Drittel zu zwei Drittel. Ähnliche Ergebnisse liefern die Auswertungen der Gruppen Normozoospermie (6 anilinnegative zu 10 anilinpositiven Proben) und der Asthenozoospermie (9 anilinnegative zu 19 anilinpositiven Proben). Lediglich in der Diagnosegruppe des OAT-Syndroms verschiebt sich dieses Verhältnis zuungunsten chromatinkondensierter anilinnegativer Spermatozoen auf ein Viertel zur Dreiviertel (5 anilinnegative Proben zu 14 anilinpositiven Proben). Obwohl, wie bereits im vorhergehenden Absatz erörtert, bisher keine Zusammenhänge der Anilinblaufärbung und den einzelnen SpermioGrammparametern gefunden werden konnte, ist der Anteil anilinpositiver und damit mangelhaft chromatinkondensierter Spermien bei Kombination von pathologisch erniedrigter Spermiedichte, -motilität und -morphologie tendenziell erhöht im Vergleich zu Ejakulaten mit normwertigen SpermioGrammparametern.

Beide Färbungen zur Erfassung der Chromatinkondensation (Anilinblaufärbung, Chromomycin A₃-Färbung), wie unter 4.8.3 aufgeführt, zeigten hochsignifikante Veränderungen der Ergebnisbereiche nach Aufarbeitung. Der Median anilinpositiver Spermien in der nativen Probe von 46% sank auf 39% in der aufbereiteten Probe.

Ebenso verbesserte sich der Median chromomycin A₃-positiver Spermatozoen von 27% auf 20%. Dies geht konform mit der Publikation von Hammadeh (Hammadeh et al. 2001a), die analog zu den hier vorliegenden Ergebnissen eine Verbesserung der Chromatinstruktur der Spermatozoen nach verschiedenen Separationstechniken, unter anderem der des Swim-Up, berichtet.

Sakkas (Sakkas et al. 2000) hingegen fand nach Aufarbeitung des Ejakulats durch Swim-Up keinen Unterschied bezüglich des Anteils chromomycin-A₃-positiver Spermatozoen. Die Spermienpräparation durch PureSperm oder Percoll hingegen führte laut seinen Ausführungen zu einem hochsignifikanten Abfall sowohl der fehlerhaften Chromatinkondensation als auch der Anzahl von DNA-Strangbrüchen.

Henkel (Henkel et al. 1994) berichtete in Bezug auf die Kernstruktur der Spermien zwar von einer Anreicherung von Spermien mit kondensierter DNA, wenn die Separation mittels Glaswollfiltration durchgeführt wurde, allerdings fand er schlechtere Ergebnisse nach Swim-Up.

5.5 Zusammenhänge zwischen klassischen SpermioGrammparametern und Spermienfunktionstests

Goldstandard der andrologischen Diagnostik ist das klassische SpermioGramm, welches Daten liefert zur Spermindichte, zur Beweglichkeit und zur Morphologie der Spermatozoen. Im Vergleich zu den teilweise mehrstündigen Färbeprozeduren der Spermienfunktionstests kann das SpermioGramm einfach und schnell erfasst werden und erlaubt so zeitnah eine Einschätzung des Fertilitätspotentials des Patienten. Allerdings ist die Möglichkeit, anhand der SpermioGrammergebnisse die Wahrscheinlichkeit des Erzielens einer Schwangerschaft vorherzusagen, deutlich limitiert (Bonde et al. 1998). Von Interesse sind daher potentielle Zusammenhänge klassischer SpermioGrammparameter mit funktionellen Spermatozoenparametern. Idealerweise könnte man so nur durch Vorliegen von Daten beispielsweise zur Spermindichte Rückschlüsse ziehen zum wahrscheinlich DNA-Status.

In der Literatur bereits erörterte Zusammenhänge von DNA-Strukturschäden und deren Einflüsse auf Spermiogrammparameter können wir durch die Resultate unserer Untersuchungen bestätigen. Ähnlich den Feststellungen von Henkel (Henkel et al. 2005a) wiesen auch unsere Ergebnisse eine hochsignifikant negative Korrelation von TUNEL-positiven Spermien mit der Spermindichte im Nativejakulat ($r=-0,514$; $p < 0,001^{**}$; $N=69$) sowie mit der Progressivmotilität WHO a+b ($r=-0,658$; $p < 0,001^{**}$; $N=69$) auf, letzteres ebenfalls in der aufbereiteten Probe ($r=-0,560$; $p < 0,001^{**}$; $N=68$).

Diese Korrelation zwischen der Spermienmotilität und der Integrität der DNA wurde auch von Giwercman (Giwercman et al. 2003) und Ramos (Ramos und Wetzels 2001) evaluiert.

Ebenso fand Borini (Borini et al. 2006) hochsignifikant negative Zusammenhänge der Spermienkonzentration und der Motilität zur DNA-Fragmentation, welche er ebenfalls mittels TUNEL-Assay ermittelte. Erwartungsgemäß korrelierte auch die Vitalität negativ mit der DNA-Fragmentation der Spermien (nativ: $r= -0,612$; $p < 0,001^{**}$; $N= 66$; Swim-Up: $r= -0,414$; $p < 0,001^{**}$; $N= 65$). Borini sieht den Grund für diese enge Beziehung von DNA-Fragmentation und schlechter Ejakulatqualität in der Ätiologie von DNA-Schäden in Spermien. Faktoren wie mangelhafte Spermienreifung, Apoptose oder ein erhöhter Level an freien Sauerstoffradikalen können möglicherweise die Struktur und damit die Funktion des Spermiums gefährden.

In diesem Kontext ist auch die Beziehung von Vitalität und der Produktion von Sauerstoffradikalen zu sehen. Hier zeichnet sich in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls ein hochsignifikanter und negativer Zusammenhang ab (nativ: $r= -0,319$; $p= 0,009^{**}$; $N= 66$; Swim-Up: $r= -0,367$; $p= 0,002^{**}$; $N= 66$).

Gleichermaßen weist auch die Chromatinkondensation, gemessen mit der Chromomycin A₃ - Färbung, negative Zusammenhänge sowohl zur Spermatozoenkonzentration ($r=-0,244^{*}$; $p=-0,303^{*}$; $N=68$) als auch zur Motilität ($r=-0,325^{**}$; $p=0,009^{**}$; $N=64$) und zur Vitalität ($r=-0,332$; $p=0,007^{**}$; $N=64$) auf. Hinsichtlich der Motilität hat auch Iranpour (Iranpour et al. 2000) diese Beziehung gefunden.

Interessant, wenn auch in der vorliegenden Arbeit nicht weiter evaluiert, ist der kürzlich publizierte Zusammenhang der Spermatozoenmorphologie mit dem Chromatinstatus. Sousa (Sousa et al. 2009) nutzte die Diff-Quik-Färbung sowie den TUNEL-Assay und fand heraus, dass der Prozentsatz auffällig gefärbter Spermatozoenköpfe („dark sperm heads“) hochsignifikant korrelierte mit dem Anteil DNA-geschädigter Spermien. Hier bietet sich eventuell eine schnelle und kostengünstige Methode, den Chromatinstatus der Spermien zu erfassen.

5.6 Die Relevanz funktioneller Spermatozoenparameter

Durch die immensen Fortschritte der Reproduktionsmedizin änderte sich auch das Patientenkontext, welchem durch die neuen Methoden der Assistierte Reproduktion geholfen werden kann. Wurde die Technik der In Vitro-Fertilisation ursprünglich zur Behandlung der tubaren Infertilität der Frau entwickelt, so können heute Patienten mit verschiedensten Ursachen der Sterilität, sowohl auf weiblicher als auch auf männlicher Seite bedingt, therapiert werden. Das bedeutet aber auch, dass diese Ursachen, die zur Kinderlosigkeit geführt haben, erneut kritisch bewertet werden müssen. Diskutiert wird dabei vor allem der Fakt, dass unreife oder möglicherweise geschädigte DNA der Grund für eine ausbleibende natürliche Schwangerschaft ist. Die dynamische Entwicklung der Assistierte Reproduktion, speziell die ICSI, macht es möglich, sämtliche natürliche Barrieren, die ein Spermium bis zur Befruchtung überwinden muss, zu umgehen. So kann nahezu allen Paaren, denen aufgrund einer andrologischen Diagnose eine Spontan Schwangerschaft versagt bleibt, zu Nachwuchs verholfen werden. Dieser therapeutische Erfolg drängt jedoch die urologisch-andrologische Diagnostik zurück, denn man weiß, dass die Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten nach ICSI keinen Zusammenhang mehr aufweisen zum ursprünglichen Spermioagrammbefund (Mansour et al. 1995, Nagy et al. 1995, Nagy et al. 1998).

Trotz dieses Fortschritts bleibt das Problem, dass sich die Kernstruktur des Sper-

miums, welches für die Injektion in die Eizelle gewählt wird, von außen kaum beurteilen lässt. Lediglich eine Evaluation hinsichtlich der Morphologie und der Motilität ist möglich. Doch obwohl diese einen negativen Zusammenhang zu DNA-Strukturschäden aufweisen (Sun et al. 1997, Lopes et al. 1998b), kann es nicht ausgeschlossen werden, dass ein Spermium mit genetischen Defekten ausgewählt wird. Es wurde gezeigt, dass auch Spermien mit Erbgutschäden eine Eizelle befruchten können (Host et al. 2000), die Schwangerschaftsrate jedoch vermindert ist. Trotz der Fähigkeit eines Spermiums mit Zellkernschäden, eine erfolgreiche Fertilisation auszulösen, erreicht die Rate an befruchteten Eizellen nach ICSI maximal zwei Drittel (Bühler et al. 2008). Ausgehend von der Vermutung, dass Fehler in der DNA-Struktur diesen Misserfolg herbeiführen, untersuchte Lopes (Lopes et al. 1998a) unter anderem mittels TUNEL-Assay die Rate an DNA-Fragmentation in Oozyten nach ICSI, welche keine Zeichen einer Befruchtung aufwiesen. Dabei fand er in der Hälfte aller Zellen fragmentierte DNA, welche wiederum zur Hälfte vom mütterlichen und zur Hälfte vom väterlichen Genom ausging, und machte diese für einen Teil der fehlgeschlagenen Befruchtungsversuche verantwortlich.

Die Ursachen der in den Spermatozoen vorkommenden DNA-Strangbrüchen scheinen vielfältig zu sein. Einerseits können apoptotische Prozesse zur Fragmentation des Erbguts führen (Cisternas und Moreno 2006). Die Apoptose ist im Rahmen der Spermatogenese ein notwendiger Vorgang, um eine kontrollierte Keimzellreifung zu gewährleisten (Rodriguez et al. 1997). Zum einen wird so die Zellzahl eines Gewebes bzw. eines Organismus kontrolliert und auf einem individuellen Niveau konstant gehalten. Andererseits wird, wie in anderen Körperzellen auch, der programmierte Zelltod als Regulationsmittel (Hikim et al. 1998) eingesetzt. Grundsätzlich gewährleistet dieser Prozess, dass eine Zelle, welche mit einer die Reparaturmechanismen überschreitenden Anzahl von Defekten behaftet ist, aus dem Gesamtverbund aller Zellen herausgelöst wird und ohne Auslösung eines Entzündungsgeschehens untergeht. Dadurch wird erreicht, dass die Zellschäden nicht in die Folgegeneration weitergegeben werden. In Bezug auf eine Körperzelle in einem Gewebe werden so dysplastische sowie potentiell maligne entartete Zellen quasi entsorgt, bevor sie größere,

das gesamte Gewebe oder gar das Überleben des Organismus bedrohende Schäden verursachen können. Die Apoptose im Rahmen der Keimzellreifung verhindert die Weitergabe von defektem Erbgut an Nachkommen. Normalerweise sollten derart veränderte Spermatozoen, bei denen bereits apoptotische Prozesse eingesetzt haben, jedoch nicht in erhöhter Zahl im Ejakulat erscheinen. Ein hoher Prozentsatz von Spermien mit fragmentierter DNA ist also möglicherweise Ausdruck einer fehlerhaften Spermienreifung. Auch im Zusammenhang mit der Chromatinkondensation, speziell im Stadium des Austauschs von Histonen gegen Protamine, kommt es physiologisch zu Brüchen innerhalb der Spermien-DNA. Die Schritte zur Kondensierung des Genoms werden dadurch erleichtert. In Bezug auf die männliche Unfruchtbarkeit konnte bereits mehrfach demonstriert werden (Lin et al. 1997a, Lin et al. 1997b), dass ejakulierte Spermien infertiler Männer ein unnatürlich hohes Vorkommen von DNA-Schäden und Plasmamembranveränderungen, beides in somatischen Zellen als Apoptosezeichen gewertet, aufweisen. Eine dritte mögliche Ursache für fragmentierte DNA in Spermien können externe Faktoren wie die von Leukozyten gebildeten Sauerstoffradikale sein. Die Auswirkungen der fragmentierten DNA ist dabei nicht nur in Bezug auf Befruchtung und Schwangerschaft wichtig. Es wird auch immer wieder postuliert, dass Schäden der DNA-Struktur der elterlichen Keimzellen kindliche Krebserkrankungen auslösen können (Aitken et al. 1998). So ist bei den Nachkommen von Rauchern das Risiko, eine Krebserkrankung bereits im Kindesalter zu entwickeln, vier- bis fünffach erhöht (Ji et al. 1997). Auch Leukämien im Kindesalter sind in Zusammenhang gebracht worden mit dem Rauchverhalten der Eltern, speziell dem des Vaters präkonzeptionell (Chang et al. 2006). Der vom Vater übertragene DNA-Schaden wird dabei durch hohe Level von Radikalen ausgelöst (Fraga et al. 1996).

Wie groß genau der Einfluss von Schäden der paternalen DNA auf die Befruchtung, Schwangerschaft und letztlich auch die Gesundheit der Nachkommen ist, wird aktuell in zahlreichen Publikationen diskutiert (Sergeie et al. 2005, Collins et al. 2008, The Practice Committee of the American Society for Reproduction Medicine 2008, Lewis et al. 2008). Nicht vergessen werden darf dabei, dass auch die Oozyte über

Kompensationsmechanismen zur Reparatur dieser Schäden verfügt. Letztlich ist das Erreichen einer Schwangerschaft ein komplex gesteuerter Vorgang. Eine Schwangerschaft nach assistierter Reproduktion ist neben den bisher genannten männlichen Faktoren beeinflusst durch das Alter der Frau (Wang et al. 2008), ihre Ovarreserve (Levi et al. 2001), die Zahl der gewonnenen Eizellen bei der Follikelpunktion und den Hormonstatus. Aus diesem Grund ist bei jedem Paar mit unerfülltem Kinderwunsch eine Vielzahl an Faktoren für das Ausbleiben einer Schwangerschaft möglich. Die Evaluation der DNA-Integrität der Spermien kann daher auch nur eine Teilantwort auf die Frage nach der Ursache der Sterilität liefern. Da diese weiterführende Diagnostik sowohl personell, zeitlich als auch finanziell aufwendig ist, scheint es sinnvoll, sie für ein bestimmtes Patientenklientel zu reservieren. Bei idiopathischer Infertilität, habituellen Aborten oder mehrfach ausbleibender Schwangerschaft trotz guter Prognose kann so gezielt nach Gründen gesucht werden.

Kapitel 6

Schlussfolgerungen

Entsprechend der physikalischen Grundlagen der Swim-Up-Technik verringerte sich die Zelldichte nach Aufarbeitung bei deutlichem Anstieg der Werte für Motilität. Es kann anhand der gefundenen Ergebnisse die Aussage gestützt werden, dass die Werte nach Aufbereitung umso besser sind, je besser die Spermioigrammparameter des Nativejakulates sind.

Trotz dieser Werterhöhung in Bezug auf die Spermatozoenmotilität wurde nach Präparation ein bedeutend höherer Anteil an DNA-Fragmentation nachgewiesen. Da sowohl im Nativejakulat als auch in den aufgearbeiteten Proben eine hochsignifikant negative Korrelation zwischen Progressivmotilität und DNA-Fragmentation evaluiert wurde, ist dieses Ergebnis unerwartet. Die Ursache der erhöhten Anzahl von DNA-Strangbrüchen konnte in dieser Arbeit nicht eruiert werden. Möglicherweise kann die Aufbereitungsprozedur selbst durch Zentrifugationsschritte und engeren Kontakt von Spermien mit radikalen Sauerstoffspezies zur Oxidation der DNA führen, ferner können auch methodische Fehler nicht ausgeschlossen werden.

Beim Vergleich der Färbungen Chromomycin A₃ und Anilinblau ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge, so dass diese Färbungen nicht als gleichwertig einzustufen sind. Womöglich werden durch diese beiden Färbemethoden verschiedene, von einander unabhängige Stadien der Chromatinkondensation sichtbar gemacht.

Hinsichtlich der Chromatinkondensation führte die Spermienaufbereitung zum Absinken des Medians sowohl CMA₃-positiver als auch anilinpositiver Spermien.

Es zeigt sich, dass es bei einem erhöhten Anteil von DNA-Strangbrüchen, in der vorliegenden Arbeit detektiert durch TUNEL-positive Spermien, auch vermehrt zu fehlerhafter Chromatinkondensation kommt. Dies ließ sich allerdings nur nachweisen, wenn der Parameter der Chromatinkondensation durch die Chromomycin A₃-Färbung bestimmt wurde. Bei Verwendung der Anilinblaufärbung ergaben sich keine Zusammenhänge zum DNA-Status der Spermien.

Eine Zunahme der DNA-Fragmentation durch Leukozyten und durch diese produzierten freie Sauerstoffradikale, sogenannte ROS, konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnten auch keine Zusammenhänge von durch die Spermien selbst produzierten intrinsischen ROS und DNA-Schäden gefunden werden.

Literaturverzeichnis

Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. 1994. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim-up and L4 filtration. *Arch Androl*, 32(3):169–74.

Agarwal A, Said TM. 2004. Sperm chromatin assessment. In: Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z, Hrsg. *Textbook of ART*, Bd 2. Kap 7. London, UK: Taylor & Francis Group, 93–106.

Ahmadi A, Ng SC. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool*, 284(6):696–704.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 59(5):1037–46.

Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nunez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. 1993. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod*, 8(7):1087–92.

Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJJ, Evenson DP, Agarwal A. 2002. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*, 78(2):319–29.

- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT. 2005. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl*, 26(6):741–8.
- Bals-Pratsch M, Behre HM, Knuth UA. 1999. WHO-Laborhandbuch. zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Springer Verlag.
- Baltz JM, Williams PO, Cone RA. 1990. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod*, 43(3):485–91.
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 15(6):1338–44.
- Benchai M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Guerin JF. 2007. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*, 87(1):93–100.
- Bhasin S. 2007. Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(6):1995–2004.
- Bühler K, Bals-Pratsch M, Kupka M, Dahncke W. 2008. Das Deutsche IVF-Register (DIR) 2007.
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. 1998. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352(9135):1172–7.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*, 21(11):2876–81.

- Carrell DT, Liu L. 2001. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl*, 22(4):604–10.
- Chang JS, Selvin S, Metayer C, Crouse V, Golembesky A, Buffler PA. 2006. Parental smoking and the risk of childhood leukemia. *Am J Epidemiol*, 163(12):1091–100.
- Cisternas P, Moreno RD. 2006. Comparative analysis of apoptotic pathways in rat, mouse, and hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 73(10):1318–25.
- Clermont Y. 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, 112:35–51.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. 2008. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril*, 89(4):823–31.
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. 1988. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, 20(3):211–7.
- Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril*, 70(2):305–14.
- Enginsu ME, Pieters MH, Dumoulin JC, Evers JL, Geraedts JP. 1992. Male factor as determinant of in-vitro fertilization outcome. *Hum Reprod*, 7(8):1136–40.
- Evenson DP, WR. 2008. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril*.
- Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. 1996. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res*, 351(2):199–203.

- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3):493–501.
- Geyter CD, Geyter MD, Schneider HP, Nieschlag E. 1992. Subnormal sperm parameters in conventional semen analysis are associated with discrepancies between fertilization and pregnancy rates in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Androl*, 15(6):485–97.
- Giwerzman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M. 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril*, 80(6):1404–12.
- Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*, 17(3):276–87.
- Hammadeh ME, Kuhnen A, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W. 2001a. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl*, 24(6):360–8.
- Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. 1998. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*, 30(1):29–35.
- Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. 2001b. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*, 46(2):99–104.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*, 81(4):965–72.

Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF. 2003a. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*, 7(4):477–84.

Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. 2005a. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril*, 83(3):635–42.

Henkel R, Maaß G, Bödeker RH, Scheibelhut C, Stalf T, Mehnert C, Schuppe HC, Jung A, Schill WB. 2005b. Sperm function and assisted reproduction technology. *Reprod Med Biol*, 4(1):7–30.

Henkel R, Maaß G, Hajimohammad M, Menkveld R, Stalf T, J V, R S, Kruger TF, Schill WB. 2003b. Urogenital inflammations: changes of leukocytes and ROS. *Andrologia*, 35:309–313.

Henkel RR, Defosse K, Koyro HW, Weissmann N, Schill WB. 2003c. Estimate of oxygen consumption and intracellular zinc concentration of human spermatozoa in relation to motility. *Asian J Androl*, 5(1):3–8.

Henkel RR, Franken DR, Lombard CJ, Schill WB. 1994. Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases? *J Assist Reprod Genet*, 11(8):395–400.

Henkel RR, Schill WB. 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:108.

Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. 1998. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(1):152–6.

- Hoppe I, Starker W. 1995. Improvement of sperm motility by a modified swim-up method [Artikel]. In: IXth World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. International Proceeding Division.
- Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. 2000. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79(7):559–63.
- Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al Taraihi TM. 2000. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet*, 17(1):60–6.
- Jequier AM. 2004. Clinical andrology—still a major problem in the treatment of infertility. *Hum Reprod*, 19(6):1245–9.
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. 1997. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst*, 89(3):238–44.
- Joshi N, Kodwany G, Balaiah D, Parikh M, Parikh F. 1996. The importance of computer-assisted semen analysis and sperm function testing in an IVF program. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 41(1):46–52.
- Levi AJ, Raynault MF, Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RTJ. 2001. Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*, 76(4):666–9.
- Lewis SEM, Agbaje I, Alvarez J. 2008. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*, 54(3):111–25.
- Lin MH, Lee RKK, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. 2008. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*, 90(2):352–9.

- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED. 1997a. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol*, 158(5):1791–3.
- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim ED. 1997b. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril*, 68(6):1065–9.
- Lindemann CB. 1996. Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton*, 34(4):258–70.
- Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. 1998a. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13(3):703–8.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. 1998b. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 69(3):528–32.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*, 52(4):864–7.
- Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. 1998. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J*, 30(1):33–9.
- Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM. 1995. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 64(5):982–6.
- Mortimer D. 1991. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 6(2):173–6.

- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Steirteghem ACV. 1995. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod*, 10(5):1123–9.
- Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Steirteghem ACV. 1998. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod*, 13 Suppl 1:143–54.
- Nieschlag, Habenicht. 1992. Epididymal proteins and sperm maturation. Springer.
- Oliva R. 2006. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 12(4):417–35.
- Oliva R, Mezquita C. 1982. Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res*, 10(24):8049–59.
- Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, Marca AL, Leo VD, Baccetti B. 2006. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch Androl*, 52(1):51–9.
- Quednau H. 1992. Pri la testado de statistikaj hipotezaroj. (deutsche Übersetzung). *Acta Sanmarinensia*, 2(5).
- Ramos L, Wetzels AM. 2001. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod*, 16(8):1703–7.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*, 16(9):2262–70.
- Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. 2000. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod*, 15(5):1112–6.

- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. 1998. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, 13 Suppl 4:11–9.
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. 2002. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, 78(6):1215–24.
- Sallam HN, Ezzeldin F, Sallam A, Agameya AF, Farrag A. 2003. Sperm velocity and morphology, female characteristics, and the hypo-osmotic swelling test as predictors of fertilization potential: experience from the IVF model. *Int J Fertil Womens Med*, 48(2):88–95.
- Schulze W, Rehder U. 1984. Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res*, 237(3):395–407.
- Sergerie M, Bleau G, Teule R, Daudin M, Bujan L. 2005. [Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility]. *Gynecol Obstet Fertil*, 33(3):89–101.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*, 6(2):139–48.
- Sousa APM, Tavares RS, de la Calle JFV, Figueiredo H, Almeida V, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. 2009. Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Hum Reprod*, 24(1):28–36.
- Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. 1999. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod*, 5(1):29–37.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 56(3):602–7.

The Practice Committee of the American Society for Reproduction Medicine. 2008. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril*, 90(5 Suppl):S178–80.

Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. 1998. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod*, 4(5):439–45.

Wang YA, Healy D, Black D, Sullivan EA. 2008. Age-specific success rate for women undertaking their first assisted reproduction technology treatment using their own oocytes in Australia, 2002–2005. *Hum Reprod*, 23(7):1633–8.

Whittington K, Ford WC. 1999. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl*, 22(4):229–35.

Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. 2001. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*, 16(9):1950–3.

Zhang X, Gabriel MS, Zini A. 2006. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl*, 27(3):414–20.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Säugetierspermatozoons, modifiziert nach Fawcett (1975). Die Einteilung eines Spermiums in Kopf-, Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück ist dargestellt.	6
4.1	Ergebnisse für Normozoospermie	21
4.2	Ergebnisse für Asthenozoospermie	21
4.3	Ergebnisse für das OAT-Syndrom	22
4.4	Fotodokumentation TUNEL-Assay	23
4.5	TUNEL-positive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung	24
4.6	Ergebnisse der DNA-Fragmentation in den einzelnen Diagnosegruppen	24
4.7	ROS-positive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung	26
4.8	Ergebnisse der ROS-positiven Spermatozoen in den einzelnen Diagnosegruppen	27
4.9	Mit Anilinblau gefärbte Spermien	28
4.10	Anilinpositive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung	28
4.11	Anilinfärbung in den einzelnen Diagnosegruppen	29
4.12	CMA ₃ -positive Spermatozoen vor und nach Aufbereitung	30
4.13	Zusammenhang von Spermatozoendichte und Progressivmotilität (WHO a+b)	31
4.14	Zusammenhang von Spermatozoendichte und Vitalität	32

4.15 Zusammenhang von Spermatozoendichte und TUNEL-positiven Spermien im Nativejakulat	32
4.16 Zusammenhang von Spermatozoendichte und ROS-produzierenden Spermatozoen im Nativejakulat	33
4.17 Zusammenhang von Spermien mit schneller Progressivmotilität (WHO a) und TUNEL-positiven Spermatozoen	34
4.18 Zusammenhang von progressiv beweglichen Spermien (WHO a+b) und TUNEL-positiven Spermatozoen	35
4.19 Zusammenhang der CMA ₃ -Färbung des aufbereiteten Ejakulates mit progressiv motilen Spermien (WHO a+b) des Nativejakulates	36
4.20 Zusammenhang von Vitalität und TUNEL-positiven Spermatozoen	37
4.21 Zusammenhang von Vitalität und ROS-produzierenden Spermatozoen	38
4.22 Zusammenhang von Vitalität mit CMA ₃ -negativen Spermatozoen im aufbereiteten Ejakulat	38
4.23 Zusammenhang von FSH i.S. und Spermatozoendichte	39
4.24 Zusammenhang von FSH i.S. und der Progressiv- (WHO a+b) sowie der schnellen Progressivmotilität (WHO a) im Nativejakulat	39
4.25 Zusammenhang von FSH i.S. und TUNEL-positiven Spermatozoen im Nativejakulat	40
4.26 Zusammenhang von TUNEL-positiven Spermatozoen im Nativejakulat und im aufbereitetem Ejakulat	41
4.27 Zusammenhang von ROS-positiven Spermatozoen (Nativejakulat) mit verschiedenen Untergruppen der CMA ₃ -Färbung	44

Tabellenverzeichnis

3.1	Einteilung der Kategorien der Anilinblaufärbung	16
4.1	Auffällige Befunde in der Anamnese	19
4.2	Patientengruppierung anhand der Spermioграмmwerte	20
4.3	Ergebnisse des TUNEL-Assays im Nativejakulat	25
4.4	Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests (paarweise)	25
4.5	Zusammenhang von Spermatozoendichte und Kategorien der Moti- lität im Nativ- sowie im aufbereiteten Ejakulat	31
4.6	Klassifikation der Spermienmotilität	33
4.7	Zusammenhang der Progressivmotilität sowie der schnellen Progres- sivmotilität im Nativejakulat mit TUNEL-positiven Spermatozoen (Nativ und Swim-Up)	35
4.8	Zusammenhang der Progressivmotilität im Nativejakulat mit ver- schiedenen Untergruppen der CMA ₃ -Färbung	36
4.9	Zusammenhang von FSH i.S. und der Progressiv- (WHO a+b) sowie der schnellen Progressivmotilität (WHO a)	40
4.10	Zusammenhang der TUNEL-positiven Spermatozoen (Nativejakulat) mit verschiedenen Untergruppen der CMA ₃ -Färbung (nach Swim-Up)	42
4.11	Zusammenhang der TUNEL-positiven Spermatozoen (nach Swim- Up) mit verschiedenen Untergruppen der CMA ₃ -Färbung (nach Swim- Up)	42

4.12 Zusammenhang von ROS-positiven Spermatozoen (Nativejakulat) mit verschiedenen Untergruppen der CMA ₃ -Färbung	43
--	----

Anhang A

Anhang

A.1 Danksagung

Ich danke

- meiner unmittelbaren Betreuerin Frau Dr. Hoppe, die es abgesehen von der eigentlichen Betreuung insbesondere schaffte, mir die Andrologie aus dem Blickwinkel des Reproduktionsmediziners nahe zu bringen. Außerdem danke ich Ihr für die Fähigkeit, mit praktischen Bezügen die experimentelle Arbeit zum Leben zu erwecken.
- Herrn PD OA Dr. Starker, der es mir nach dem Weggang von Prof. Dr. Henkel schnell und unkompliziert ermöglichte, meine Promotion weiter zu führen.
- Herrn Prof. Dr. Henkel für die Vergabe des interessanten Themas und die raschen Rückmeldungen, sowohl aus Jena als auch aus dem fernen Südafrika.
- Frau Ebertus für die Erstellung der Spermiogrammdaten und so manche aufwendige Recherche.
- Frau Weigand für ihre Hilfe bei der Durchführung zahlloser Färbungen.
- Prof. Dr. Schubert für die Bereitstellung der Räumlichkeiten in der Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

- meinen Eltern für unzählige Momente des Rückhalts und für den Glauben an meine Berufswahl.
- meinem Partner Tobias Exner von ganzem Herzen für die alltägliche Unterstützung, Liebe und Motivation.

A.2 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronisch zugreifbaren Version nicht veröffentlicht.

Publikationen

Henkel R, Bastiaan HS, Schüller S, Hoppe I, Starker W, Menkveld R. 2010. *Leukocytes and intrinsic ROS production may be factors compromising sperm chromatin condensation status*. Andrologia, 42(2):69-75.

Menkveld R, Henkel R, Schüller S, Hoppe I, Starker W: *An investigation of the relationships between sperm morphology parameters, reactive oxygen species production in semen and sperm DNA status*. 4th European Congress of Andrology, 07.-10.12.2006, Toulouse, France.

A.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Dr. Hoppe, PD OA Dr. Starker, Prof. Dr. Henkel, Tobias Exner
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.